

Fernanda da Rocha Lapa

Avaliação da Atividade Antinociceptiva, Antiinflamatória  
e Protetora Gástrica do Extrato Hidroalcoólico Bruto da  
*Polygala paniculata* L.

CURITIBA  
2006

Fernanda da Rocha Lapa

Avaliação da Atividade Antinociceptiva, Antiinflamatória  
e Protetora Gástrica do Extrato Hidroalcoólico Bruto da  
*Polygala paniculata* L.

Dissertação desenvolvida no Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e no Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina durante o curso de Pós-Graduação em Farmacologia e apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Adair Roberto Soares dos Santos

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Consuelo Andrade Marques

CURITIBA  
2006

## **AGRADECIMENTOS**

*À DEUS, pela proteção e saúde, por iluminar meus caminhos em busca do conhecimento e realização pessoal.*

*À minha família, pelo amor e incentivo e por estar presente no decorrer de todo este trabalho.*

*Ao amigo e professor orientador Adair Roberto Soares dos Santos e à professora co-orientadora Maria Consuelo Andrade Marques, pelos ensinamentos transmitidos, paciência, confiança em mim depositada e pelo exemplo de dedicação à ciência.*

*Ao professor Moacir G. Pizzolatti e seus alunos, pela preparação do extrato e isolamento dos compostos.*

*Ao meu namorado, Vinícius Scalco Costa, pelo seu grande companheirismo, incentivo e compreensão demonstrados em todos os momentos desta jornada.*

*À Cristina Setim Freitas e à Critiane Hatsuko Baggio, pela parceria e amizade no decorrer deste estudo.*

*À CAPES pelo apoio financeiro.*

*Aos amigos da Pós-graduação em Neurociências de Florianópolis, pelo imenso apoio e ensinamentos que contribuíram decisivamente para o desenvolvimento deste trabalho.*

*À todos colegas e docentes do curso de Pós-graduação em Farmacologia da UFPR, pelo respeito, amizade e conhecimento transmitidos.*

*O valor das coisas não está no tempo que  
elas duram, mas na intensidade com que  
acontecem. Por isso existem momentos  
inesquecíveis, coisas inexplicáveis e  
pessoas incomparáveis.*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

A *Polygala paniculata* L. é conhecida por vários nomes populares, dentre eles, “barba-de-são-jão, bromil, vassourinha branca e mimosa”. Esta planta é utilizada na medicina popular para o tratamento da asma, bronquite, artrite, dor de estômago e diarreia. O presente estudo investiga as possíveis atividades antinociceptiva, antiinflamatória e protetora gástrica do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* (EHPP), e os efeitos antinociceptivos de mais três compostos isolados a partir desta planta: a febalosina, auraptén e rutina, em vários modelos experimentais *in vivo*, em ratos e camundongos. Quando administrado por via oral (v.o.), o EHPP reduziu a nocicepção induzida pelo ácido acético, formalina, capsaicina e glutamato, sem influenciar no período de latência no modelo de nocicepção térmica (*tail-flick*). O efeito antinociceptivo do EHPP não foi influenciado pelo pré-tratamento com L-arginina (precursor do óxido nítrico) ou com naloxona (antagonista de receptores opióides), quando verificado no modelo do glutamato e não está relacionado com efeitos inespecíficos como relaxamento muscular ou sedação, como o observado na caixa de movimentação espontânea. Os compostos isolados, administrados por via intraperitoneal (i.p.), apresentaram efeito antinociceptivo no modelo do glutamato, sendo que a rutina foi mais potente e eficaz neste modelo de nocicepção. Além disso, o EHPP e a rutina, reduziram a nocicepção induzida pela administração intratecal de glutamato e NMDA, bem como de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . O EHPP reduziu de forma parcial a inflamação induzida pela carragenina no modelo do edema de pata e pleurisia. No teste de lesões gástricas agudas, induzidas pelo etanol 70%, o EHPP, administrado pela v.o. e i.p., apresentou importante atividade protetora gástrica, reduzindo o índice de úlceras e aumentando a produção de muco gástrico, em ratos. Contudo, o EHPP não protegeu a mucosa gástrica contra lesões induzidas pela indometacina, nem alterou o volume e pH da secreção gástrica, quando avaliados no modelo da ligadura pilórica em ratos e, tão pouco, alterou a motilidade gastrointestinal e o esvaziamento gástrico, quando avaliado no modelo do vermelho de fenol, em camundongos. Em síntese, os dados analisados em conjunto, permitem sugerir que o EHPP e os compostos isolados, principalmente a rutina, apresentam

importante efeito antinociceptivo, e esta ação está envolvida a participação direta ou indireta dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos tipo NMDA e de citocinas pró-inflamatórias. O EHPP reduziu, de maneira parcial, o edema de pata e a migração celular induzidos pela carragenina nos modelos de edema de pata e pleurisia. Em adição, foi possível demonstrar que o EHPP protegeu a mucosa gástrica de ratos contra lesões induzidas pelo etanol, esta ação citoprotetora envolve o aumento da secreção de muco gástrico. Finalmente, os resultados mostram que o EHPP apresenta importante atividade antinociceptiva, antiinflamatória e protetora gástrica, confirmando a utilização popular da *P. paniculata*.

**Palavras-chave:** *Polygala paniculata* L., nocicepção, glutamato, inflamação, gastroproteção, muco, plantas medicinais.

## ABSTRACT

The *Polygala paniculata* L., is known by a popular name of “barba-de-são-joão, bromil, vassourinha branca and mimosa”. It is used in the folk medicine for the treatment of asthma, bronchitis, arthritis, stomach pain and diarrhea. The present study examined the gastroprotective, antiinflammatory and antinociceptive effects of the hydroalcoholic extract of *P. paniculata* (HEPP), in several experimental models *in vivo*, in rats and mice. The antinociceptive effect of compounds isolated from this plant: phebalosin, auraptene and rutin, was also evaluated. The HEPP, given orally (p.o.), reduced the nociception induced by acetic acid, formalin, capsaicin and glutamate, without influence the latency to noxious stimulus in the tail-flick model in mice. The HEPP antinociception was neither affected by the pre-treatment with L-arginine or by the antagonist of opioid receptors, naloxone, nor associated with nonspecific effects such as muscle relaxation or sedation, as observed in the spontaneous locomotor activity test. The isolated compounds given by intraperitoneal route (i.p.) also presented antinociceptive activity in the glutamate model of pain. The rutin was the compound with the greatest potency and efficacy in the glutamate test. Both, HEPP and rutin reduced the nociceptive response induced by intrathecal injection of glutamate and NMDA, as well IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . The extract reduced partially the oedema induced by carrageenan when accessed in the paw oedema in rats, but it was more efficacious in inhibit leukocyte migration in the pleurisy induced by same phlogistic agent in mice. The treatment of rats with HEPP by p.o. or i.p. route, decreased the index of lesions and increased the gastric mucus production, in the acute gastric lesions caused by ethanol 70%. On the other hand, the extract neither protected the mucosa against indomethacin induced lesions, nor changed the volume and pH of gastric secretion, when accessed in the model of pylorus ligation. The HEPP did not alter the gastrointestinal motility or gastric emptiness as determined by the phenol red model in mice. The data from the current study show that the HEPP and isolated compounds, mainly the rutin, produce an important antinociceptive effect, which could be related with a direct or indirect interaction with the NMDA type glutamatergic ionotropic receptors and pro-inflammatory cytokines

(IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ). The extract reduced partially, the oedema and the cell migration, induced by carrageenan, when accessed in the paw oedema and pleurisy acute models of inflammation. Moreover, was possible to show, that the HEPP presented gastroprotective action against ethanol induced lesions. These effects were probably related with increased mucus production, and maybe, this could be responsible for its citoprotective effects. Finally our results show that EHPP presented important antinociceptive, antiinflammatory and gastroprotective effects, confirming the popular use of *P. paniculata*.

**Key-words:** *Polygala paniculata*, nociception, glutamate, inflammation, gastroprotection, mucus, medicinal plants.



## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xii</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xiv</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1	Família Polygalaceae e plantas do gênero <i>Polygala</i> .....	17
1.2	<i>Polygala paniculata</i> L.....	19
1.3	Mecanismos envolvidos na nocicepção.....	22
1.4	Mecanismos envolvidos na etiologia da úlcera péptica e citoproteção gástrica.....	29
<b>2.0</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>35</b>
<b>3.0</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
3.1	Objetivos gerais.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
<b>4.0</b>	<b>MATERIAL e MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
4.1	Animais.....	37
4.2	Classificação botânica.....	37
4.3	Preparação do extrato, identificação, isolamento e purificação dos compostos.....	38
4.3.1	Preparação do extrato e purificação dos compostos.....	38
4.3.2	Isolamento e purificação dos compostos.....	38
4.4	Drogas e soluções usadas.....	39
4.5	Análise farmacológica <i>in vivo</i> .....	39
4.5.1	Vias de administração.....	39
4.6	Métodos.....	40
4.6.1	Teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%), em camundongos.....	41
4.6.2	Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5%), em camundongos.....	41
4.6.3	Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, em camundongos.....	42
4.6.4	Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato.....	43
4.6.5	Teste da retirada da cauda ( <i>tail-flick</i> ).....	44

4.6.6	Efeito sobre o desempenho motor no teste de atividade locomotora espontânea.....	45
4.6.7	Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptivo do EHPP, em camundongos.....	45
4.6.7.1	Participação do sistema opióide.....	45
4.6.7.2	Participação da via L-arginina-óxido nítrico.....	46
4.6.7.3	Participação do sistema glutamatérgico.....	46
4.6.7.4	Participação de citocinas como a IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ .....	47
4.7	Estudo da atividade antiinflamatória do EHPP.....	48
4.7.1	Avaliação da atividade antiinflamatória do EHPP no modelo do edema de pata induzido pela administração intraplantar de carragenina, em ratos.....	48
4.7.2	Avaliação da atividade antiinflamatória do EHPP no modelo de pleurisia induzido pela carragenina, em camundongos.....	48
4.8	Estudo da atividade antiúlcera e anti-secretora ácida do EHPP, em ratas.....	49
4.8.1	Lesões gástricas induzidas por etanol.....	49
4.8.2	Lesões gástricas induzidas por indometacina.....	50
4.8.3	Avaliação das lesões gástricas nos modelos de indução aguda.....	51
4.8.3.1	Determinação do índice de úlceras.....	51
4.8.3.2	Quantificação do muco gástrico.....	51
4.8.4	Método de estudo <i>in vivo</i> : Método da ligadura pilórica.....	52
4.8.5	Estudo dos mecanismos de ação envolvidos no possível efeito protetor gástrico do EHPP, em ratas.....	53
4.8.6	Avaliação do EHPP sobre a motilidade gastrointestinal.....	53
4.8.6.1	Trânsito intestinal, em camundongos.....	53
4.8.6.2	Esvaziamento gástrico de semi-sólidos.....	54
4.9	Análise Estatística.....	55
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
5.1	Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%), em camundongos.....	56
5.2	Nocicepção induzida pela administração intraplantar de formalina (2,5%) em camundongos.....	57
5.3	Nocicepção induzida pela administração intraplantar de capsaicina (1,6 $\mu$ g/pata) em camundongos.....	58
5.4	Efeito do EHPP no modelo do <i>tail – flick</i> em camundongos.....	59
5.5	Efeito do EHPP sobre o desempenho motor no teste de atividade locomotora espontânea.....	60

5.6	Efeito do EHPP e dos compostos isolados, febalosina, aurapten e rutina sobre a nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato, em camundongos.....	61
5.7	Curva tempo-resposta do EHPP no modelo de nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato em camundongos.....	63
5.8	Análise do mecanismo de ação do EHPP.....	64
5.8.1	Efeito do pré-tratamento com L-arginina.....	64
5.8.2	Participação do sistema opióide.....	65
5.8.3	Efeito do EHPP e da rutina sobre a nocicepção causada pela injeção intratecal de aminoácidos excitatórios (AAE).....	66
5.8.4	Efeito do EHPP e da rutina sobre a nocicepção causada pela injeção intratecal de IL-1 $\beta$ (1 pg) e TNF- $\alpha$ (0,1 pg).....	68
5.9	Atividade antiinflamatória do EHPP.....	69
5.9.1	Efeito do EHPP no edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, em ratos.....	69
5.9.2	Efeito do EHPP na pleurisia induzida pela injeção intrapleural de carragenina, em camundongos.....	70
5.10	Atividade protetora gástrica do EHPP.....	71
5.10.1	Efeito do EHPP sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70%, em ratas.....	71
5.10.2	Efeito do EHPP sobre a quantidade de muco da mucosa gástrica após a indução de lesões com etanol 70%, em ratas.....	72
5.10.3	Influência da inibição da óxido nítrico sintase sobre a atividade protetora gástrica do EHPP, após a indução de lesões com etanol 70%, em ratas.....	73
5.10.4	Efeito do EHPP sobre as lesões gástricas agudas induzidas por indometacina, em ratas.....	74
5.10.5	Avaliação da atividade anti-secretora gástrica o EHPP.....	75
5.10.5.1	Efeito do EHPP sobre a secreção ácida gástrica basal (não estimulada), quando avaliado no modelo da ligadura pilórica, em ratas.....	75
5.11	Avaliação da atividade do EHPP sobre as atividades gerais do trato gastrointestinal.....	77
5.11.1	Atividade do EHPP sobre o trânsito intestinal e esvaziamento gástrico.....	77
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>98</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Partes aéreas da <i>Polygala paniculata</i> L.....	<b>20</b>
<b>Figura 2:</b>	Partes aéreas da <i>Polygala paniculata</i> L.....	<b>20</b>
<b>Figura 3:</b>	Foco das flores .....	<b>20</b>
<b>Figura 4:</b>	Flavonóide e cumarinas isoladas da <i>Polygala paniculata</i> L.....	<b>21</b>
<b>Figura 5:</b>	Efeito do EHPP sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético, em camundongos.....	<b>56</b>
<b>Figura 6:</b>	Efeito do EHPP sobre a nocicepção induzida pela formalina, em camundongos.....	<b>57</b>
<b>Figura 7:</b>	Efeito do EHPP sobre a nocicepção induzida pela capsaicina, em camundongos.....	<b>58</b>
<b>Figura 8:</b>	Efeito do EHPP e da morfina sobre latência ao estímulo térmico nocivo aplicado no método da teste da retirada da cauda <i>tail-flick</i> , em camundongos....	<b>59</b>
<b>Figura 9:</b>	Efeito do tratamento dos animais com EHPP sobre o desempenho motor, em camundongos.....	<b>60</b>
<b>Figura 10:</b>	Efeito do EHPP na nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato, em camundongos.....	<b>61</b>
<b>Figura 11:</b>	Efeito da febalosina, aurranten e rutina em relação a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato, em camundongos.....	<b>62</b>
<b>Figura 12:</b>	Curva tempo-resposta do EHPP no modelo de nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato em camundongos.....	<b>63</b>
<b>Figura 13:</b>	Efeito do pré-tratamento com L-arginina sobre a antinocicepção causada pelo EHPP.....	<b>64</b>
<b>Figura 14:</b>	Efeito do pré-tratamento com naloxona sobre a antinocicepção causada pelo EHPP.....	<b>65</b>
<b>Figura 15:</b>	Efeito antinociceptivo do EHPP e da rutina sobre a nocicepção causada pela injeção intratecal de glutamato, NMDA e trans-ACPD, em camundongos.....	<b>67</b>
<b>Figura 16:</b>	Efeito antinociceptivo do EHPP e da rutina em relação a nocicepção causada pela injeção intratecal de IL-1 $\beta$ (1 pg) e TNF- $\alpha$ (0,1 pg).....	<b>68</b>
<b>Figura 17:</b>	Efeito do EHPP sobre o edema de pata causado pela administração intraplantar de carragenina, em ratos.....	<b>69</b>
<b>Figura 18:</b>	Efeito do pré-tratamento com EHPP na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	<b>70</b>
<b>Figura 19:</b>	Efeito do EHPP, sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70%, em ratas.....	<b>71</b>

<b>Figura 20;</b>	Efeito do tratamento dos animais com EHPP sobre as concentrações de muco da mucosa glandular gástrica de ratas.....	<b>72</b>
<b>Figura 21:</b>	Efeito do pré-tratamento com L-NAME e do etanol 70% sobre a atividade protetora gástrica do EHPP, em ratas.....	<b>73</b>
<b>Figura 22:</b>	Efeito do EHPP sobre as lesões gástricas agudas induzidas por indometacina, em ratas.....	<b>74</b>
<b>Figura 23:</b>	Efeito do EHPP sobre a secreção ácida gástrica basal, em ratas.....	<b>76</b>
<b>Figura 24:</b>	Atividade do EHPP sobre o trânsito intestinal e esvaziamento gástrico, em camundongos.....	<b>77</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAE</b>	<b>Amino ácido excitatório</b>
<b>AMPA</b>	<b><math>\alpha</math>-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalopropionato</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenosina trifosfato</b>
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	<b>Cálcio</b>
<b>CCD</b>	<b>Cromatografia de camada delgada</b>
<b>CCK<sub>2</sub></b>	<b>Receptor da colecistocinina tipo 2</b>
<b>COX</b>	<b>Ciclooxigenase</b>
<b>COX-2</b>	<b>Ciclooxigenase-2</b>
<b>CGRP</b>	<b>Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina</b>
<b>C<sub>3</sub>a</b>	<b>Componente C<sub>3</sub>a do sistema complemento</b>
<b>C<sub>5</sub>a</b>	<b>Componente C<sub>5</sub>a do sistema complemento</b>
<b>ECL</b>	<b>Célula enterocromoafim</b>
<b>EHPP</b>	<b>Extrato hidroalcoólico da <i>Polygala paniculata</i></b>
<b>E.P.M.</b>	<b>Erro padrão da média</b>
<b>EXINS</b>	<b>Interneurônios excitatórios</b>
<b>GLU</b>	<b>Glutamato</b>
<b>H</b>	<b>Hora</b>
<b>IASP</b>	<b>Associação internacional para estudo da dor</b>
<b>DI<sub>50</sub></b>	<b>Dose que reduziu a resposta em 50% quando comparado ao grupo controle</b>
<b>ININS</b>	<b>Interneurônios inibitórios</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>Interleucina-1 beta</b>
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	<b>Interleucina-1 alfa</b>
<b>IL- 8</b>	<b>Interleucina- 8</b>
<b>IM</b>	<b>Inibição máxima</b>
<b>i.d.</b>	<b>Intraduodenal</b>
<b>i.p.</b>	<b>Intraperitoneal</b>
<b>i.pl.</b>	<b>Intrapleural</b>
<b>i.pt.</b>	<b>Intraplantar</b>
<b>i.t.</b>	<b>Intratecal</b>
<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Potássio</b>
<b>KA</b>	<b>Cainato</b>
<b>KCl</b>	<b>Cloreto de potássio</b>
<b>L- NAME</b>	<b>L-arginina metil éster</b>
<b>L- NOARG</b>	<b>N<sub>ω</sub>-nitro-arginina</b>
<b>LTP</b>	<b>Potencial de longa duração</b>

<b>min.</b>	<b>Minutos</b>
<b>MeHg</b>	<b>Metil mercúrio</b>
<b>Na<sup>+</sup></b>	<b>Sódio</b>
<b>NaOH</b>	<b>Hidróxido de sódio</b>
<b>NMDA</b>	<b>N-metil-D-aspartato</b>
<b>NO</b>	<b>Óxido nítrico</b>
<b>NOS</b>	<b>Sintase do óxido nítrico</b>
<b>NRM</b>	<b>Núcleo magno da rafe</b>
<b>PAG</b>	<b>Substância cinzenta periaquedutal</b>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	<b>Prostaglandina E<sub>2</sub></b>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	<b>Prostaglandina I<sub>2</sub></b>
<b>PME</b>	<b>Porcentagem de efeito máximo</b>
<b>PN</b>	<b>Neurônios de projeção</b>
<b>RVM</b>	<b>Medula rostroventomedial</b>
<b>s.c.</b>	<b>Subcutânea</b>
<b>SNC</b>	<b>Sistema nervoso central</b>
<b>SNE</b>	<b>Sistema nervoso entérico</b>
<b>SP</b>	<b>Substância P</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Fator de necrose tumoral – alfa</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas, como medicamento para o tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana, remonta à idade antiga (CALIXTO, 2001).

As primeiras drogas foram as de origem natural, extraídas principalmente de plantas superiores e destinavam-se à terapia de doenças infecciosas. De fato, povos antigos, como os do mediterrâneo, chineses, hindus e maias (séculos antes da era atual), já conheciam o emprego terapêutico de certas plantas e de alguns minerais (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1988).

Nesse sentido, a terapêutica moderna, composta por um grande número de medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria atingido o grau de desenvolvimento atual se não fosse o auxílio dos produtos naturais, notadamente aqueles derivados das plantas superiores (CALIXTO, 2001).

São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, de fontes naturais, especialmente de plantas, incluindo dentre outros a morfina, a pilocarpina, os digitálicos, os curares, a quinina, a artemisina, a atropina, escopolamina e o cromolin. Além disso, cerca de 60% a 75% dos medicamentos para tratamento do câncer e de doenças infecciosas que estão disponíveis no mercado ou em fase clínica de desenvolvimento, são derivados de produtos naturais (FARNSWORTH e BINGEL, 1997; CALIXTO, 2001; NEWMAN *et al.*, 2003; BOLDI, 2004).

Estes dados justificam o crescente interesse da indústria farmacêutica na produção de agentes terapêuticos de origem natural, inclusive em países de clima tropical, como o Brasil, que apresentam grande biodiversidade. Entre os países da América Latina, somente o Brasil detém cerca de 20-22% das plantas e micro-organismos do planeta (CALIXTO, 2005). Porém, apesar de toda diversidade natural, até por volta do ano 1996, cerca de 84% das drogas presentes no mercado brasileiro eram importadas e 60% de todas as drogas processadas eram consumidas por



somente 23% da população, fazendo com que os remédios caseiros a base de plantas medicinais se mantivesse como a principal fonte de medicamentos para a maioria da população (ELIZABETSKY e COSTA-CAMPOS, 1996; ELIZABETSKY, 1999).

Apesar do Brasil não ter uma indústria farmacêutica forte, o comércio interno de medicamentos registrado no país atinge hoje a casa dos 10 bilhões de dólares, sendo o sétimo mercado mundial em termos de vendas. Dentro desse contexto, as plantas medicinais e em especial o uso dos medicamentos fitoterápicos adquirem importância como agentes terapêuticos e, por isso, devem ser prioritariamente analisados segundo os métodos modernos disponíveis (LAPA *et al.*, 1999; CALIXTO, 2001).

Para a sociedade dos países em desenvolvimento, a produção e utilização de fitoterápicos padronizados com seus benefícios comprovados e de alta qualidade, podem facilitar o acesso da população a medicamentos seguros e de baixo custo, facilitando ainda o crescimento da fitomedicina nacional e desta forma, apresentando impacto na economia local (ELIZABETSKY e COSTA-CAMPOS, 1996).

### **1.1 Família Polygalaceae e plantas do gênero *Polygala***

As plantas da família *Polygalaceae* são predominantemente encontradas em regiões tropicais. Entre as plantas desta família, incluem-se as do gênero *Polygala*, que compreende cerca de 500 espécies, apresentando-se a maior parte das vezes na forma de arbustos ou de pequenas trepadeiras que cobrem galhos de árvores. Suas flores apresentam cor rosa ou branca e variam entre as espécies (GENTRY, 1996).

Os membros da família *Polygalaceae* são conhecidos por conter uma grande diversidade de compostos químicos, muitos dos quais exibem significativa atividade biológica. Investigações fitoquímicas em diferentes espécies de *Polygala* revelaram vários compostos incluindo lignanas citotóxicas (DALL'ACQUA *et al.*, 2002), saponinas (DESBENE *et al.*, 1999; ESTRADA *et al.*, 2000; CHUNG *et al.*, 2002),

xantonas (EL SAYAH, *et al.*, 1999; MAK *et al.*, 2001; DALL'ACQUA *et al.*, 2002; CRISTIANO *et al.*, 2003), cumarinas e flavonóides (CRISTIANO *et al.*, 2003).

Investigações sobre as ações de compostos como lignanas e xantonas, isoladas da *Polygala vulgaris* L., em relação à proliferação celular de tumores sólidos, demonstraram que principalmente as xantonas apresentaram atividade antiproliferativa em tumores sensíveis e não sensíveis ao tratamento com doxorubicina, um importante quimioterápico (DALL'ACQUA *et al.*, 2002).

A *Polygala tenuifolia* W., rica em saponinas, é utilizada a centenas de anos, na medicina coreana e chinesa, no tratamento de doenças psicóticas. Estudos de *binding* mostraram sua afinidade por receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos. Estudos adicionais *in vivo* demonstraram que estas saponinas são capazes de reduzir a psicose promovida pela síndrome serotoninérgica, induzida experimentalmente pela 5-hidroxitriptamina e o comportamento de hiperatividade induzido pela cocaína em ratos (CHUNG *et al.*, 2002).

Recentemente, foi demonstrado que o extrato aquoso das raízes de *Polygala tenuifolia* W. inibiu a liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) em cultura de astrócitos de camundongos, sugerindo que esta planta pode apresentar uma importante atividade antiinflamatória central (KIM *et al.*, 1998). Além disso, foi demonstrado que o extrato das raízes desta planta também apresentou ação neuroprotetora contra a morte celular induzida pelo N-metil-D-aspartato (NMDA) em cultura de células cerebelares de ratos (LEE *et al.*, 2004).

O extrato hidroalcoólico da *Polygala fallax* H., quando analisado *in vivo*, apresentou um importante efeito antiinflamatório, promovendo uma diminuição do edema de orelha provocado pela administração tópica de xilol (KOU *et al.*, 2003).

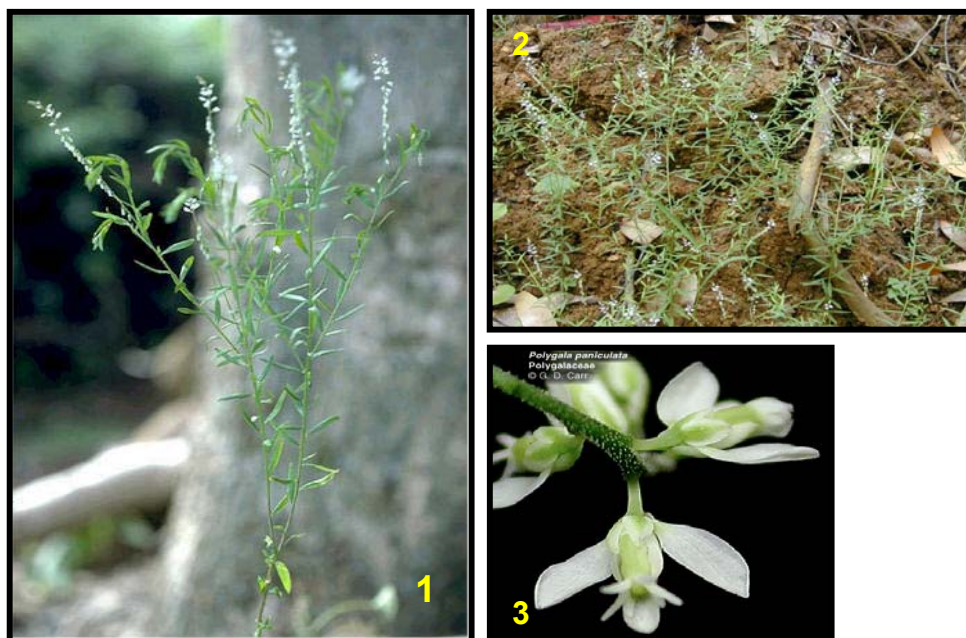
Em um estudo com outra planta da família Polygalaceae, a *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin, foi demonstrado que tanto o seu extrato hidroalcoólico quanto a 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi xantona, isolada a partir deste extrato, apresentaram notável atividade antinociceptiva quando analisados nos modelos de nocicepção induzida pelo ácido acético, formalina, capsaicina e no modelo de hiperalgesia induzida pela bradicinina e substância P (CAMPOS *et al.*, 1997).

Posteriormente, um estudo complementar, realizado pelo mesmo grupo, demonstrou através de experimentos *in vitro*, utilizando traquéia isolada de cobaia não sensibilizada e sensibilizada por ovalbumina, que tanto o extrato hidroalcoólico quanto a 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi xantona, isolada da *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin., apresentaram importante efeito antiespasmódico, contra contrações induzidas pela acetilcolina, KCl, bradicinina, prostaglandina E<sub>2</sub>, histamina, substância P, composto 48/80 (composto liberador de histamina) e U46619 (um análogo estável do tromboxano A<sub>2</sub>) (EL SAYAH *et al.*, 1999).

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que as frações clorofórmica, etanólica e butanólica obtidas a partir do extrato bruto da *Polygala sabulosa* A. W. Bennett, bem como vários compostos isolados a partir destas frações, como dihidroestiril-2-pirona e estiril-2-pirona,  $\alpha$ -espinasterol, escopoletina, além dos compostos modificados a partir da escopoletina, a acetilescopoletina e bezoilescopoletina apresentaram importante atividade antinociceptiva, no modelo das contorções abdominais, induzidas pelo ácido acético 0,6% (MEOTTI *et al.*, 2006). Em adição, o  $\alpha$ -espinasterol e a escopoletina foram cerca de 55 a 91 vezes mais potentes que todos outros os compostos isolados testados neste estudo. O  $\alpha$ -espinasterol e a escopoletina também foram de 313 a 400 vezes mais potentes que o acetaminofeno e a aspirina, quando analisados no modelo do ácido acético (MEOTTI *et al.*, 2006).

## **1.2 *Polygala paniculata* L.**

A *Polygala paniculata* L. (Fig. 1, 2 e 3) é uma planta que cresce na costa Atlântica brasileira, sendo encontrada também no litoral de Santa Catarina. É conhecida popularmente como barba-de-são-joão, barba-de-bode, bromil, vassourinha branca e mimosa, sendo seu chá utilizado na medicina popular para o tratamento da asma, bronquite crônica, demais afecções do aparelho respiratório, artrite, artrose, água no joelho, problemas renais, dor de estômago, diarreia, bem como tonificante (NEWALL *et al.*, 1996; LORENZI e MATOS, 2002).

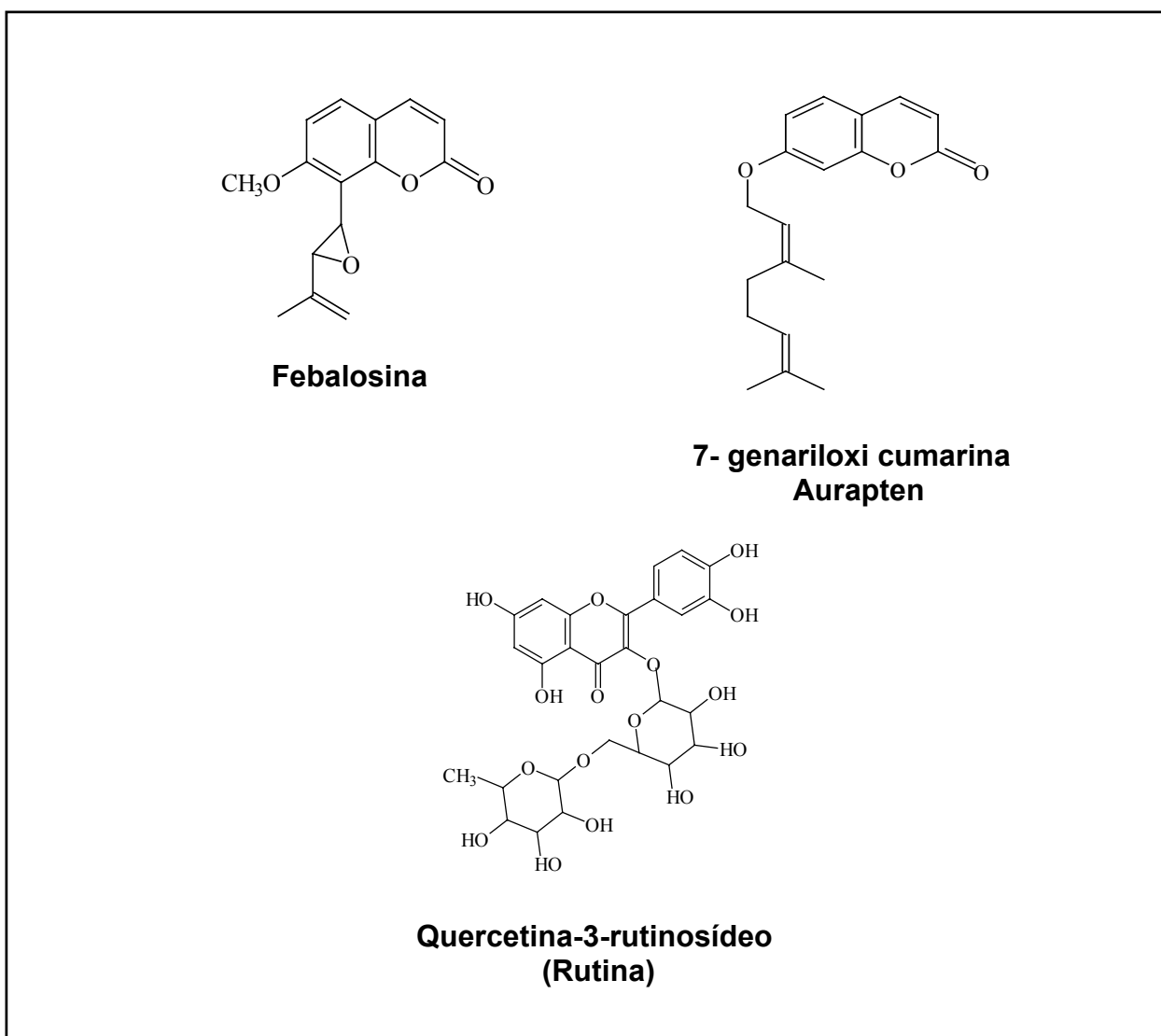


**Figura 1, 2 e 3:** Partes aéreas da *Polygala paniculata* L. (Fig.1 e 2); foco das flores (Fig. 3).  
 Fonte:(Fig. 1) Warren L. Wagner (2005); (Fig. 2): Forest & Kim Starr (2005); (Fig. 3): G.D. Carr (2005).

Alguns compostos da *P. paniculata* já foram identificados e isolados. CRISTIANO *et al.* (2003) isolaram em suas análises três xantonas (denominadas 1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona, 1,5-dihidroxi-3,2-dimetoxixantona e 1-hidroxi-2,3,5-trimetoxixantona). A presença de outros compostos como cumarinas e um flavonóide rutina foi observada. Dois esteróis também foram caracterizados como o espinasterol e delta 25-espinasterol.

Estudos recentes mostraram que o extrato bruto hidroalcoólico da *P. paniculata* (EHPP) possui importante atividade antioxidante. Esta atividade foi relacionada ao seu efeito protetor contra a neurotoxicidade induzida pelo tratamento crônico de camundongos com metilmercúrio (MeHg) (FARINA *et al.*, 2005). Existem evidências indicando que as células cerebelares são as células mais atingidas após a intoxicação por MeHg. Dessa forma, a intoxicação por este agente afeta principalmente o sistema motor (GRANDJEAN *et al.*, 1997; SANFELIU *et al.*, 2003).

O tratamento com o EHPP foi capaz de reverter completamente o prejuízo motor provocado pelo MeHg e restabeleceu a atividade da glutathiona peroxidase e da glutathiona redutase, no córtex cerebral e cerebelo, que estava diminuída e aumentada pelo tratamento com MeHg, respectivamente (FARINA *et al.*, 2005). Os autores sugeriram que o efeito apresentado pelo extrato, está relacionado a presença de xantonas e flavonóides, que são compostos que apresentam importante efeito antioxidante.



**Figura 4:** Flavonóide e cumarinas isoladas da *Polygala paniculata* L.

Fonte: Cortesia Prof<sup>o</sup> Moacir Pizzolatti

### 1.3 Mecanismos envolvidos na nocicepção

A dor é um sintoma de muitas desordens clínicas e afeta grande parte da população (BESSON e DICKENSON, 1997). Ela é uma característica cardinal dos mecanismos protetores fisiológicos normais e uma das suas funções é preservar o organismo, evitando o dano tecidual (DRAY, 1997).

Segundo a IASP - Associação Internacional para Estudo da Dor, a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termo de tal lesão (MELZACK e LOESER, 1999; RAINVILLE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Além envolver um estímulo potencialmente nocivo, a dor tem uma conotação individual e é representada por uma experiência subjetiva, incluindo componentes afetivos e emocionais, que amplificam ou diminuem a sensação dolorosa (MELZACK e LOESER, 1999; RAINVILLE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2004).

O fenômeno doloroso pode ocorrer espontaneamente, em decorrência da redução do limiar de sensibilidade para dor, devido a danos no SNC ou ainda lesão nas fibras sensoriais. A este tipo de dor é atribuído o termo de dor neuropática (MILLAN, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Existe uma diferença entre os termos nocicepção e dor. O termo nocicepção refere-se a manifestações neurofisiológicas, geradas por estímulos nocivos. A dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e requer a capacidade de abstração e elaboração do impulso sensorial (MELZACK e LOESER, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Em termos de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda é caracterizada por ser pontual delimitada e desaparecer com a resolução do processo patológico. A dor crônica persiste por um longo período de tempo, sendo associada à processos patológicos crônicos e mudanças no padrão de transmissão neuronal (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Na maioria das situações, o processo inflamatório pode estar relacionado aos mecanismos que envolvem a nocicepção (LEVINE e REICHLING, 1999).

A inflamação caracteriza-se por um fenômeno complexo multimediado. Ela é uma resposta desencadeada por traumas, lesões teciduais e invasão por agentes infecciosos, com a finalidade de eliminar microorganismos ou outros agentes irritantes e potenciar o reparo tecidual (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os sinais clínicos da inflamação, eritema, calor, inchaço e dor, foram descritos no início da era clássica pelos gregos e romanos (FANTONE e WARD, 1990). O quinto sinal da inflamação, lesão aguda dos tecidos, com perda da função dos órgãos foi mencionado mais tarde por Virchow, no século XIX (ROCHA e SILVA, 1978).

Neste contexto, a inflamação pode ser classificada como aguda e crônica, de acordo com o tempo de duração e características patológicas (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A inflamação aguda apresenta curta duração (horas a meses). Durante o processo inflamatório agudo, muitos mediadores como o NO e prostaglandinas como prostaglandina  $I_2$  ( $PGI_2$ ), prostaglandina  $D_2$  ( $PGD_2$ ), prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) e prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) promovem principalmente vasodilatação, um dos sinais clássicos do processo inflamatório agudo, representado pelo calor e rubor característicos da reação inflamatória (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Outro sinal precoce da inflamação aguda é a formação do edema, que ocorre devido ao fluxo transvascular de fluido rico em proteínas (plasma) dos compartimentos intravasculares para o interstício devido ao aumento de permeabilidade vascular de capilares e vênulas, como resultado da liberação de histamina, bradicinina, leucotrienos, fatores do complemento, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) no sítio inflamatório (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A vasodilatação e formação de exsudato são geralmente acompanhadas da marginação, adesão e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos. Na fase aguda da resposta inflamatória, ocorre a liberação de vários mediadores em especial componentes do complemento como os fragmentos C3a e C5a, leucotrienos, quimiocinas como a IL-8 e ainda bioprodutos bacterianos como peptídeos N-

formilados, que promovem a quimiotaxia de leucócitos e outras células fagocíticas para o sítio da reação inflamatória (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; ADEREM e SMITH, 2004).

A inflamação aguda pode finalizar-se com a resolução de todos eventos característicos da reação inflamatória e retorno do tecido lesionado à normalidade ou sua substituição por tecido conjuntivo (GILROY et al., 2004; ADEREM e SMITH, 2004).

A progressão da resposta tecidual para inflamação crônica caracteriza-se por infiltração de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Os processos inflamatórios crônicos são de duração prolongada estendendo-se de semanas a meses. Durante a inflamação crônica ocorrem simultaneamente: a presença de processo inflamatório ativo, tentativas de reparo tecidual com conseqüente destruição do tecido e formação de fibrose. Entre as doenças crônicas inflamatórias incluem-se desordens como artrite reumatóide, aterosclerose e lupus eritematoso sistêmico (GILROY et al., 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A liberação de mediadores, em tecidos inflamados pode sensibilizar fibras nociceptivas periféricas, promovendo a facilitação central da transmissão nociceptiva (SYRIÁTOWICZ *et al.*, 1999; VANEGAS, 2004), levando a uma resposta dolorosa aumentada a um estímulo nocivo, chamado de hiperalgesia (TJØLSEN e HOLE 1997; VANEGAS, 2004; SOMMER e KRESS, 2004; COUTAUX *et al.*, 2005). Alterações na percepção sensorial, envolvendo sensibilização central, pode levar a alodínia, que está relacionada a dor evocada por um estímulo normalmente não nocivo (MILLAN, 1999).

O processo inflamatório resulta da liberação de vários mediadores, alguns deles podendo ativar ou sensibilizar os nociceptores locais das fibras aferentes periféricas (C e A $\delta$ ). Contribuindo em maior parte para o desenvolvimento da dor de origem inflamatória, bem como aumento e/ou expressão de moléculas como neurotransmissores, enzimas, canais iônicos e receptores (LEVINE *et al.*, 1993; DRAY, 1994; BESSON e DICKENSON, 1997; COUTAUX *et al.*, 2005).



A propagação da dor é iniciada com a ativação de receptores sensíveis aos estímulos nocivos, amplamente encontrados na pele, membranas, tecidos conectivos de órgãos viscerais, ligamentos, cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões e vasos sangüíneos. Os nociceptores correspondem às terminações nervosas livres e representam a parte mais distal dos neurônios aferentes de primeira ordem, que consistem nas fibras de pequeno diâmetro, dos tipos A $\delta$  e do tipo C, respectivamente (JULIUS e BASBAUM, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2004).

As fibras A $\delta$ , são fibras pouco mielinizadas, de médio diâmetro que medeiam a “primeira” dor, representada pela dor pungente, aguda e passageira, que aparece logo após a lesão tecidual. As fibras C, não mielinizadas de pequeno diâmetro, medeiam a “segunda” dor, uma dor mais latente e difusa, que se perpetua por mais tempo (JULIUS e BASBAUM, 2001; CRAIG, 2003).

Estas fibras podem ser chamadas de polimodais, pois respondem a estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos. Dessa forma, apresentam receptores termosensíveis ao calor e ao frio, bem como receptores específicos para substâncias algogênicas (HUNT e MANTYH, 2001; IKEDA *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2004; COUTAUX *et al.*, 2005).

Os corpos celulares dos neurônios sensoriais, de grande diâmetro, localizados na raiz do gânglio dorsal, dão origem as fibras mielinizadas, de rápida condução, chamadas de fibras primárias aferentes A $\beta$ . Estas fibras detectam estímulos inócuos aplicados sobre a pele, músculos e juntas, não contribuindo para condução da dor, em situações normais (MILLAN, 1999).

Dentro deste contexto, basicamente, os neurônios aferentes primários podem ser ativados por uma gama de mediadores, liberados no tecido lesado. A lesão tecidual pode ser desencadeada por estímulos térmicos, traumas mecânicos, invasão com agentes infecciosos e reações antígeno-anticorpo (SAWYNOK, 2003). Estes mediadores promovem a despolarização das fibras aferentes primárias A $\delta$  e C que irão conduzir o impulso doloroso, iniciado em diferentes tecidos, para o corno dorsal da medula espinhal, principalmente até suas lâminas mais superficiais,

lâminas I/II e profundas V/VI e X (HUNT e MANTYH, 2001; MILLAN, 2002; CRAIG, 2003).

A partir da integração dos impulsos no corno dorsal, as vias nociceptivas aferentes dão origem a diferentes modelos de projeção à estruturas corticais e supracorticais. Neste estágio, os componentes sensoriais; discriminativos e afetivos, bem como os componentes cognitivos, são atribuídos ao impulso nociceptivo (WILLIS *et al.*, 1997; MORROW *et al.*, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Os diferentes feixes ascendentes que se formam devido à interação de neurônios de primeira ordem com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal darão origem a diversas vias ascendentes que podem ser classificadas em dois grupos: monossinápticas e polissinápticas (MILLAN, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004).

As vias de projeção monossinápticas projetam-se diretamente a estruturas cerebrais superiores e incluem os feixes: espinotalâmico, espinoreticular, espinomencefálico, espinoparabraquio-amigdalóide, espinoparabraquio-hipotalâmico, espinohipotalâmico e neoespinotalâmico. O outro sistema, polissináptico, apresenta uma estação de retransmissão a neurônios de segunda ordem que conduzem a informação nociceptiva aos centros superiores cerebrais e consistem nos feixes paleoespinotalâmico, espinocervical e coluna dorsal polissináptica (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Muitas destas vias ascendentes fazem conexões com neurônios de terceira ordem no tálamo, que projetam seus axônios pela cápsula interna do córtex somatosensorial até o giro pós-central, onde a localização do estímulo nociceptivo é realizada; e giro anterior do cíngulo, relacionado a interpretação emocional da dor (RUSSO e BRODE, 1998).

Dentro deste contexto, há uma complexa e integrativa rede neuronal até estruturas supraespinhais, que constituem as vias ascendentes. Estas regiões supraespinhais são extensivamente interligadas e também interagem com mecanismos da modulação descendente, permitindo a ativação rápida de circuitos envolvidos no controle da dor (MILLAN, 1999).

As vias descendentes originam-se no tronco cerebral e outras estruturas como hipotálamo, córtex e tálamo, bem como o núcleo magno da rafe (NRM), substância cinzenta periaquedutal (PAG) e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (RVM), que exercem um importante papel na modulação e integração das mensagens nociceptivas no corno dorsal (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004).

Os mecanismos descendentes modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações em nociceptores presentes nas fibras primárias aferentes, bem como em neurônios intrínsecos do corno dorsal, como interneurônios excitatórios (EXINS), interneurônios inibitórios (ININS) e neurônios de projeção (PN) (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002).

Acredita-se que um importante componente modulador da resposta nociceptiva esteja presente no sistema de “analgesia” proveniente da RVM e pode estar relacionado a dois tipos de neurônios, as chamadas células “liga” (*on*) e “desliga” (*off*) (MILLAN, 1997; MASON, 1999; MILLAN, 2002; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004).

É proposto que as células “liga” (*on*) medeiem a facilitação da condução de estímulos nociceptivos e as células “desliga” (*off*) medeiem a inibição da transmissão da dor, provocada pela estimulação da PAG e liberação de opióides endógenos, diminuindo a sensação dolorosa (MASON, 1999; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004).

A importância de alguns mediadores na modulação das vias descendentes ainda não está totalmente esclarecida, contudo acredita-se que as vias serotoninérgica, noradrenérgica e em menor extensão a dopaminérgica contemplam os maiores componentes dos mecanismos descendentes (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002). Outros mediadores como a colecistocinina, encefalinas, glutamato e NO também estão envolvidos neste mecanismo (MILLAN, 1999; VANEGAS, 2004; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004).

De uma maneira geral, os mediadores que participam da resposta nociceptiva podem ser produzidos pelo sistema vascular, células imunes, tecido lesado, nervos sensoriais. Dentre os principais mediadores incluem-se: cininas, histamina,

serotonina, adenosina trifosfato (ATP), prótons, peptídeos, prostaglandinas e citocinas (DRAY, 1997; JULIUS e BASBAUM, 2001; SAWYNOK, 2003).

Grandes evidências indicam que os aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato, que é encontrado primariamente em fibras sensoriais C, apresentam um papel crítico na transmissão da informação nociceptiva da medula espinhal até estruturas centrais (MILLAN, 1999; BEIRITH *et al.*, 2002; BEIRITH *et al.*, 2003).

No nível espinhal, o glutamato está presente nos terminais aferentes primários, nas lâminas I, III e IV do corno dorsal. Nas fibras C o glutamato coexiste com peptídeos como a substância P (SP), desta forma um estímulo nocivo liberaria ambos, peptídeos e aminoácidos excitatórios das fibras nociceptivas aferentes e estes agiriam de maneira sinérgica na transmissão da dor (DICKENSON, 1997; BEIRITH *et al.*, 2004).

Existem dois grupos distintos de receptores glutamatérgicos denominados ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), cainato (KA) e  $\alpha$  - amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) são canais iônicos permeáveis ao  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}$  ou  $\text{K}^{+}$ . (DICKENSON, 1997; BEIRITH *et al.*, 2002).

Fortes evidências sugerem que os receptores glutamatérgicos ionotrópicos, sensíveis ao NMDA (um análogo do glutamato), são receptores formados por várias subunidades (NR1/NRA2, NR1/NRB2, NR1/NRC2, NR1/NRD2) e encontram-se amplamente distribuídos no SNC (OZAWA *et al.*, 1997; YAMAKURA e SHIMOJI, 1999).

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos ( $\text{mGluR}$ ) dividem-se em oito subtipos classificados em três subgrupos de acordo com a sua homologia. O grupo I ( $\text{mGluR}$  1 e 5) promove ativação da via da fosfolipase C; o grupo II ( $\text{mGluR}$  2 e 3) e o grupo III ( $\text{mGluR}$  4, 6 e 7) estão acoplados negativamente a adenilato ciclase (OZAWA *et al.*, 1997).

Fortes indícios sugerem que os aminoácidos excitatórios e seus receptores, além de contribuírem com a transmissão dolorosa, estão envolvidos na patogenia da dor neuropática (hiperalgesia), assim como desordens neurológicas crônicas, além de participarem de eventos como plasticidade neuronal e formação do potencial de

longa duração (LTP) (OZAWA *et al.*, 1997; MILLAN, 1999; YAMAKURA e SHIMOJI, 1999).

É importante mencionar que tanto na dor clínica quanto na dor induzida em modelos experimentais não há, a princípio, um mediador ou uma via (ascendente ou descendente) dominante que contribua para a condução e perpetuação do estímulo nociceptivo. Dependendo do local, tipo e duração do estímulo, levando-se em conta componentes afetivos e emocionais, ocorrem a ativação de múltiplos canais sensoriais, que irão convergir e interagir com estruturas supraespinhais, promovendo a sensação global de dor (MILLAN, 1999).

#### **1.4 Mecanismos envolvidos na etiologia da úlcera péptica e citoproteção gástrica**

O estômago apresenta muitas funções como motilidade, digestão, secreção ácida e controle dos mecanismos de defesa da mucosa, além de manter o tônus do esfíncter esofágico e pilórico. Estas funções são fortemente influenciadas pela liberação de hormônios gastrintestinais como a gastrina, colecistocinina e somatostatina, bem como pelo sistema nervoso entérico (SNE), (EKBLAD *et al.*, 2000).

O sistema nervoso entérico é formado basicamente por dois plexos: o plexo mioentérico e o plexo submucoso. Os neurônios que pertencem a estes plexos são chamados de neurônios intrínsecos. O plexo mais externo denominado mioentérico ou de Auerbach inerva as camadas musculares circular e longitudinal e regula a função motora. O plexo submucoso, um plexo mais interno, inerva a mucosa e controla a absorção, secreção gastrintestinal e o fluxo sanguíneo local (COSTA e BROOKES, 1994; EKBLAD *et al.*, 2000).

Os neurônios intrínsecos dos dois plexos do SNE realizam conexões com neurônios do sistema nervoso simpático, parassimpático e neurônios sensoriais. Estes neurônios são denominados neurônios extrínsecos (EKBLAD *et al.*, 2000).

A maioria dos neurônios extrínsecos alcança o estômago através do nervo vago. As fibras vagais são pré-ganglionares parassimpáticas e terminam nos gânglios do plexo mioentérico. A estimulação das fibras parassimpáticas produz aumento geral da motilidade e secreção gástrica (COSTA e BROOKES, 1994; EKBLAD *et al.*, 2000).

Os neurônios simpáticos são pós-ganglionares e inervam principalmente o gânglio entérico e os vasos sangüíneos, inibindo a motilidade e a atividade secretora do trato gastrintestinal e estimulam a contração da *mucularis mucosae* e de alguns esfíncteres (LONGHUST *et al.*, 1984 a-b).

A inervação da mucosa também apresenta importante papel na proteção gástrica, em particular, as fibras aferentes sensíveis a capsaicina têm sido implicadas diretamente na resposta aguda à agressão na mucosa, promovendo a dilatação das arteríolas da submucosa e aumentando rapidamente a circulação sangüínea local. Este mecanismo é mediado pela liberação de neuropeptídeos, fatores de crescimento e liberação de óxido nítrico (MOZSIK, 1997; EKBLAD *et al.*, 2000; MATSUMOTO *et al.*, 2001; VONGTHAVARAVAT *et al.*, 2003).

De uma maneira geral, uma variedade de mensageiros neuronais (acetilcolina, CGRP, NO), hormonais (gastrina), parácrinos (histamina e somatostatina), fatores de crescimento (TGF- $\alpha$ ), estão relacionados tanto com o processo de proteção, quanto com a regulação de várias funções fisiológicas da mucosa, entre elas a secreção de ácido (SCHUBERT, 2005).

A secreção de ácido clorídrico no estômago é mediada pelas células parietais, presentes em maior quantidade nas glândulas oxínticas (ou gástricas), que estão localizadas na mucosa oxíntica, que se estende pelo corpo e fundo gástrico. Na glândula oxíntica também se encontram as células principais ou pépticas que secretam pepsinogênio; as células secretoras de muco; as células D que liberam somatostatina e células enterocromoafins envolvidas na síntese e secreção de histamina (COSTA e BROOKES, 1994; YAO e FORTE, 2003).

Basicamente, a mucosa gástrica é revestida por uma série de glândulas com células epiteliais superficiais e além da mucosa oxíntica, no antro gástrico, encontramos a mucosa antral (HOGBEN *et al.*, 1974).

Nesta mucosa, as glândulas apresentam os mesmos tipos de células que as glândulas oxínticas com exceção das células parietais. Nas glândulas da mucosa antral o tipo celular mais numerosos são as células G, que secretam gastrina (LLOYD e DEBAS, 1994; MÔZSIK *et al.*, 1997).

A acetilcolina e a histamina, juntamente com a gastrina, constituem os principais secretagogos envolvidos na secreção de ácido pela célula parietal (SACHS, 1997; FUKUSHIMA *et al.*, 2004). Via estimulação vagal, a acetilcolina é liberada, ativando mecanismos intracelulares nas células parietais, através da interação com receptores muscarínicos ( $M_3$ ), promovendo liberação de ácido. As células G da mucosa antral secretam gastrina, que atua em receptores do tipo  $CCK_2$  e que juntamente com a acetilcolina, promove a liberação de histamina pelas células enterocromoafins (ECL). Além disso, a gastrina pode interagir com os receptores  $CCK_2$  na célula parietal e estimular diretamente a produção de ácido. A histamina liberada contribui com a liberação de ácido pelas células parietais, através da sua interação com os receptores  $H_2$  (SACHS *et al.*, 1997; SCHUBERT, 2005).

De acordo com Glavin e Szabo (1992), acreditava-se que a secreção de ácido gástrico era o principal fator envolvido na ulceração da mucosa gástrica. Contudo, em 1987, Isenberg e colaboradores demonstraram que pacientes com úlcera duodenal apresentavam também diminuição da secreção de bicarbonato, dessa forma percebeu-se que não só o excesso de um fator agressivo, mas também, a deficiência de um mecanismo de defesa estava contribuindo com a ulceração da mucosa.

Atualmente, está bem estabelecido que independentemente da etiologia da úlcera, esta é formada quando ocorre um desequilíbrio entre os fatores agressivos luminiais (ácido clorídrico e pepsina) e fatores de defesa da mucosa (secreção de muco e bicarbonato, prostaglandinas, fluxo sangüíneo e migração de granulócitos),

ocasionando irritação, ulceração da mucosa e sangramento (WALLACE, 2001; WHITLLE, 2004; DEMBINSKI *et al.*, 2005).

As úlceras gástricas são formadas no estômago e as formadas no duodeno são chamadas de úlceras duodenais. De maneira geral podemos chamar tanto as localizadas no estômago quanto no duodeno de úlceras pépticas que são lesões crônicas, na maioria das vezes solitárias, que ocorrem em qualquer nível do trato gastrointestinal exposto à ação agressiva dos sucos ácidos-pépticos (DAYAL e De LELLIS, 1989).

Geralmente, os estímulos lesivos sobre a mucosa, responsáveis pela formação de úlceras pépticas, são acompanhados por danos microvasculares locais, com conseqüente isquemia, diminuição da distribuição de nutrientes, formação de radicais livres e necrose tecidual (TARNAWSHI, 2005).

Um dos principais fatores de defesa da mucosa contra agentes agressivos consiste em uma fina camada aderente de muco, que serve como uma barreira física sobre a mucosa e é continuamente secretado por células epiteliais. O bicarbonato é secretado juntamente pelas mesmas células, constituindo a chamada barreira muco-bicarbonato. O muco e o bicarbonato formam uma camada gelatinosa que protege a mucosa do suco gástrico. Acredita-se que esta barreira forma a primeira linha de defesa da mucosa do estômago e duodeno contra agentes nocivos como o HCl, a pepsina luminal e outros agentes lesivos (MÖZSIK *et al.*, 1997; BI e KAUNITZ, 2003).

Contraditoriamente, o HCl pode ser considerado um fator de defesa de mucosa, reduzindo a possibilidade de colonização por bactérias, fungos e parasitas (WALLACE, 2001).

A barreira de proteção gástrica não depende somente da secreção de muco e bicarbonato, mas também, depende essencialmente dos mecanismos fisiológicos, como a secreção de prostaglandinas, para manter suas propriedades defensivas (HOLZER, 2000). A síntese local de prostaglandinas, principalmente as prostaglandinas da série E (E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e 16,16diMePGE<sub>2</sub>) e a PGI<sub>2</sub>, contribuem com a manutenção dos mecanismos de defesa, estimulando produção de muco, secreção



alcalina no estômago e duodeno e aumento da microcirculação local (MÒZSIK *et al.*, 1997).

Atualmente, sabe-se que o uso crônico de medicamentos que inibem a produção de prostaglandinas, como os antiinflamatórios não esteroidais (AINES), causa danos à mucosa gástrica, constituindo um fator de risco para eventos adversos como ulceração, sangramento e perfuração gástrica (WHITTLE, 2004; NEWTON, 2005). A utilização de medicamentos como anticoagulantes, antiinflamatórios esteroidais, também contribuem com a formação de úlceras (JONES e HAWKEY, 2001).

Não só o uso de medicamentos, mas também, a idade é um dos principais fatores para o aumento da prevalência e patogênese da úlcera péptica, principalmente no estômago, devido à perda gradual de mecanismos de proteção e reparo da mucosa, envolvendo diminuição do conteúdo de prostaglandinas (JONES e HAWKEY, 2001; NEWTON, 2005).

Vários outros fatores também favorecem o surgimento de ulceração na mucosa. Entre eles estão: o aumento de secreção gástrica de ácido, aumento dos níveis circulantes de catecolaminas, isquemia da mucosa gástrica, infecção por *Helicobacter pylori*, fatores genéticos e o estilo de vida (que engloba o estresse, uso abusivo de álcool, fumo e hábitos alimentares) (PAPPAS, 1999; WALLACE, 2001; BAGGIO *et al.*, 2003; ELLIOT e WHITTLE, 2004; DEMBINSKI *et al.*, 2005).

Devido aos vários fatores predisponentes, pacientes portadores de úlcera péptica tornaram-se comuns em países industrializados (DAYAL e De LELLIS, 1989).

Dessa forma, nos últimos anos, as lesões gastrointestinais vêm tornando-se um dos principais focos de investigações experimentais e clínicas, adquirindo ênfase comercial para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (WHITTLE, 2004).

Segundo Wallace, 2001, a chave para o desenvolvimento de melhores estratégias terapêuticas é a identificação e caracterização de fatores de crescimento e outros mediadores, ainda não esclarecidos, que possam apresentar papel central no processo de reparo da úlcera. Outro alvo importante para a pesquisa, no futuro,

seria o melhor entendimento de como podemos melhorar a qualidade da cicatrização da úlcera e ainda evitar sua recorrência.

Dentro deste contexto, as plantas medicinais apresentam importância como agentes terapêuticos, visto sua ampla utilização na medicina popular, no tratamento relacionado à sintomatologia de desordens gástricas tais como úlceras gástricas e gastrites (SCHMEDA-HIRSCHMANN e YESILADA, 2005).

## 2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, o desenvolvimento de fitoterápicos tem recebido muita atenção tanto por parte da comunidade científica, quanto pelas indústrias farmacêuticas. Apesar da grande aceitação e seu extenso uso terapêutico pela população em geral, principalmente a de baixa renda, as plantas medicinais têm sido relativamente pouco avaliadas cientificamente, sendo, dessa forma, necessário estudos mais detalhados no sentido de verificar e assegurar sua qualidade, segurança e eficácia.

Os produtos naturais apresentam-se como fonte de compostos com potencial atividade biológica, assim, a descoberta de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos ou de novos agentes terapêuticos, representa uma possibilidade para o tratamento de patologias gástricas e processos inflamatórios associados à dor, podendo determinar uma melhor qualidade de vida para os pacientes.

Dessa maneira, a importância deste estudo, se justifica na confirmação das propriedades antinociceptivas, antiinflamatória e citoprotetora da *Polygala paniculata* L., tendo como base o seu emprego na medicina tradicional. Estudos complementares foram realizados com o objetivo de esclarecer os possíveis mecanismos de ação envolvidos e validar seu uso popular.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral:

Avaliar a possível atividade antinociceptiva, antiinflamatória e gastroprotetora do extrato hidroalcoólico da *P. paniculata* (EHPP) e os mecanismos de ação envolvidos nestes efeitos.

#### 3.2 Específicos:

- Verificar os efeitos antinociceptivos do EHPP em modelos de nocicepção química (testes do ácido acético, formalina, capsaicina, glutamato, NMDA, trans-ACPD, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) e térmica ( modelo do *tail-flick*) em camundongos.
- Verificar a atividade antinociceptiva dos compostos isolados da *P. paniculata* (febalosina, aurapten e rutina) no modelo de nocicepção química induzida pelo glutamato e por citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ).
- Verificar, com o emprego de técnicas farmacológicas *in vivo*, o(s) possível(is) mecanismo(s) envolvido(s) no efeito antinociceptivo da planta através da utilização de agonistas e antagonistas seletivos de vários receptores que modulam a nocicepção.
- Verificar a atividade protetora gástrica através dos modelos de lesões gástricas agudas induzidas pelo etanol 70% e pela indometacina.
- Verificar a atividade anti-secretora ácida do EHPP através do método da ligadura pilórica.
- Verificar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na ação protetora gástrica do EHPP através de técnicas farmacológicas *in vivo*, utilizando agonistas e antagonistas seletivos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar adultos (160 a 230 g) e camundongos Swiss adultos (18 a 35 g) fêmeas, provenientes do biotério central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e do biotério central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os animais foram mantidos em temperatura constante ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com umidade relativa do ar entre 30% e 70%, ciclo claro-escuro de 12 horas e tratados com água e ração *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório para sua adaptação por um período de pelo menos 1 h antes da realização dos experimentos, os quais foram conduzidos entre 8 e 17 horas à temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da UFPR sob protocolo nº 41685/04-46/2004 – 110. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais para o estudo com os animais de laboratório (ZIMMERNANN, 1983).

### **4.2 Classificação botânica**

A *P. paniculata* foi coletada no município de Florianópolis, na praia de Daniela (Estado de Santa Catarina) e foi classificada pelo Dr. Olavo de Araújo Guimarães, do Departamento de botânica da Universidade Federal do Paraná. Um exemplar está catalogado no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR sob o registro UPCNB 26027.

### **4.3 Preparação do extrato, identificação, isolamento e purificação dos compostos**

#### **4.3.1 Preparação do extrato e identificação dos compostos**

A obtenção do extrato bruto hidroalcoólico da *P. paniculata* (EHPP) e a identificação, isolamento e purificação dos compostos foi realizada pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Profº Moacir Pizzolatti do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Cerca de 1000g da planta inteira, seca e triturada foram submetidos à extração, por maceração em 80% de etanol-água, à temperatura ambiente ( $22 \pm 3^\circ \text{C}$ ), por 14 dias. O etanol foi evaporado e o extrato (rendimento 50g) foi concentrado ao nível desejado.

Os estudos fitoquímicos conduzidos com o extrato da *P. paniculata* demonstraram a presença de muitos constituintes (CRISTIANO *et al*, 2003). Usando métodos químicos e de espectroscopia (EIMS, IR,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{CNMR}$ , NOE, DIF), foi identificada a estrutura de duas xantonas (1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona e 1,5-dihidroxi-3,2-dimetoxixantona) e a presença de outros compostos como cumarinas e o flavonóide rutina. Usando cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massa, dois esteróis foram caracterizados (espinasterol e delta25-espinasterol) e uma xantona em menor quantidade (1-hidroxi-2,3,5-trimetoxixantona).

#### **4.3.2 Isolamento e purificação dos compostos**

O composto isolado aurapten foi obtido a partir do extrato bruto diclorometano. A febalosina foi isolada a partir da cera edicuticular da *P. paniculata* e a rutina foi obtida a partir do extrato bruto hidroalcoólico da *P. paniculata* conforme descrito por Missau e colaboradores (dados não publicados).

#### 4.4 Drogas e soluções usadas

Foram utilizadas as seguintes drogas e soluções: ácido acético, formalina, hidrocloreto ou hidrobrometo de morfina (Merck AG, Darmstadt, Alemanha), N<sub>ω</sub>-nitro-L-arginina (L-NOARG), L-arginina-metil-éster (L-NAME), L-arginina, glutamato, carragenina lambda, capsaicina, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , cimetidina (Sigma Chemical CO., St Luis, MO, EUA), hidrocloreto de naloxona (Research Biochemicals International, Natick, MA, EUA), éter etílico, álcool etílico, sacarose, alcian blue e cloreto de magnésio (Biotec). Os demais reagentes e sais utilizados foram de alto grau de pureza analítica e procedência Merck.

A capsaicina foi dissolvida em etanol absoluto e carbonato de sódio (0,5%).

Os compostos isolados, febalosina e aurapten foram diluídos em uma mistura de tween 80 e salina (NaCl 0,9%), sendo que a concentração final de tween não excedeu a 10%, de modo a não influenciar na atividade exercida pelos compostos.

As demais drogas e o extrato hidroalcoólico e a rutina foram diluídos em salina.

#### 4.5 Análise Farmacológica *in vivo*

##### 4.5.1 Vias de administração

Para avaliar a atividade antinociceptiva do EHPP, de modo sistêmico, o mesmo foi administrado por via oral (v.o.) e os compostos isolados (febalosina, aurapten e rutina) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.). Os animais foram tratados por v.o. e i.p., com diferentes doses do extrato ou compostos, respectivamente 60 e 30 minutos antes da administração dos agentes indutores da nocicepção, que foram administrados por via i.p., intraplantar (i.pt.) e via intratecal (i.t.).

A atividade antiinflamatória do EHPP foi avaliada através da administração de diferentes doses do extrato por v.o., respectivamente 60 minutos antes da administração dos agentes flogísticos, que foram administrados por via i.pt. e intrapleural (i.pl.).

A atividade protetora gástrica foi verificada através da administração do EHPP por v.o., 1 h antes e por via i.p., 30 min. antes da administração dos agentes indutores da lesão gástrica. Para indução das lesões gástricas, o etanol foi administrado por v.o. e a indometacina por via subcutânea (s.c.). O extrato também foi administrado por via intraduodenal (i.d.), durante a cirurgia da ligadura do piloro.

#### 4.6 Métodos

A metodologia utilizada para verificar a atividade antinociceptiva EHPP consistiu inicialmente na utilização de modelos de nocicepção química, induzida pelo ácido acético (0,6%, 450 µl/ animal, i.p.), formalina (2,5%, 20 µl/pata), capsaicina (1,6 µg/pata), glutamato (10 µmol/pata; 175 nmol/ sítio, i.t.), NMDA (450 pmol/sítio, i.t.), Trans-ACPD (50 nmol/sítio, i.t.), IL-1 $\beta$  (1 pmol/sítio, i.t.) e TNF- $\alpha$  (0,1pmol/sítio, i.t.). Também foi utilizado o modelo de nocicepção térmica, o *tail-flick* (potência 90W). (SCHEIDT *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 1999; BEIRITH *et al.*, 2002).

Com a finalidade de verificar a ação antiinflamatória do EHPP, foi utilizado como agente flogístico, a carragenina tanto nos modelos de edema de pata (300 µg/pata) como no modelo de pleurisia (1%, 0,1ml/sítio).

A atividade protetora gástrica do EHPP foi verificada através de modelos de indução aguda de lesões gástricas induzidas por etanol 70% (0,5 ml/animal, v.o.) e por indometacina (20 mg/kg, s.c.). A secreção ácida gástrica foi avaliada através do modelo da ligadura pilórica. O trânsito intestinal e o esvaziamento gástrico foram verificados através do método do vermelho de fenol.



#### **4.6.1 Teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%), em camundongos**

Este modelo consiste na indução da resposta nociceptiva através da administração intraperitoneal de ácido acético (0,6%) diluído em solução salina. A administração de ácido acético por via intraperitoneal provoca irritação da membrana serosa, o que ocasiona movimentos estereotipados, os quais são caracterizados por contração da musculatura abdominal (contorções abdominais), juntamente com a extensão de uma das patas posteriores (COLLIER *et al.*, 1968; SANTOS *et al.*, 1999; LE BARS *et al.*, 2001).

Grupos de animais foram pré-tratados por via oral com o EHPP, nas doses de 5, 10, 50, 100 e 200 mg/kg, 1 h antes da injeção do ácido acético. Os grupos controles receberam o mesmo volume do veículo (salina, 10 ml/kg, v.o.) utilizado para diluir o extrato. Após a administração do ácido acético, os animais foram colocados sob funis de vidro individuais transparentes e durante 20 minutos, o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente. A atividade antinociceptiva do extrato pôde ser obtida através da comparação do número de contorções abdominais quantificadas entre os grupos controle (tratado com o veículo) e tratado com o EHPP.

#### **4.6.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5%), em camundongos**

Para confirmação do efeito antinociceptivo do EHPP, foi utilizado o teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, na pata traseira direita, (HUNSKAAR e HOLE, 1987 e SANTOS *et al.*, 1999). Este modelo é mais específico que o teste de contorções abdominais, permitindo avaliar dois tipos de dor: a dor de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a dor inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios). Os

animais pré - tratados com o EHPP, receberam 20  $\mu$ l de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) por via intraplantar, na superfície ventral da pata posterior traseira. Logo após a injeção da formalina os animais foram colocados individualmente dentro de um funil de vidro, ao lado de um espelho para facilitar a observação. Em seguida o tempo foi cronometrado durante 30 minutos.

O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi quantificado cumulativamente em segundos como índice de nocicepção. Os 5 min iniciais, após a administração intraplantar de formalina, correspondem à primeira fase (dor de origem neurogênica) da nocicepção desencadeada por este agente nociceptivo. A segunda fase, que ocorre entre 15 a 30 min após a administração de formalina, representam a resposta tônica à nocicepção, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores inflamatórios. Ao fim do experimento os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e para verificar a ação antiedematogênica do EHPP, a pata que recebeu o agente nociceptivo foi cortada na altura da articulação e pesada em balança analítica. A diferença entre a pata que recebeu o agente algogênico e a pata que não o recebeu, corresponde ao edema, em mg, como descrito por Ferreira *et al.*, 1999 e Beirith *et al.*, 2002.

Grupos de animais foram previamente tratados com o EHPP por via oral, nas doses de 0,0001, 0,001, 0,01 e 0,1 mg/kg, 1 h antes da injeção da formalina. Os animais controle receberam igual volume do veículo (salina, 10 ml/kg, v.o.) utilizado para diluir o extrato.

#### **4.6.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, em camundongos**

Esse modelo foi proposto para o estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurogênica. A injeção de capsaicina induz estimulação direta dos neurônios nociceptivos e causa a liberação de vários neuropeptídeos e aminoácidos excitatórios, envolvidos na transmissão dolorosa, incluindo principalmente as

taquicininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B) e o glutamato, respectivamente (SAKURADA *et al*, 1992, SAKURADA *et al*, 1996).

Os animais foram colocados sob funis de vidro transparentes individuais, para um período de adaptação de 20 minutos. Após, esse período, cada animal recebeu por via intraplantar 20 µl de solução de capsaicina (1,6 µg/pata) na pata posterior direita, sendo que o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com capsaicina foi cronometrado por um período de 5 min e considerado como índice de nocicepção. Grupos de animais foram tratados com o EHPP, nas doses de 0,01, 0,1 0,5, 1,0 e 10 mg/kg por via oral 1 h antes da injeção da capsaicina. Os animais controles receberam igual volume dos veículos utilizados (salina, 10 ml/kg, v.o.) para diluir o extrato.

#### **4.6.4 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato, em camundongos**

Para testar a hipótese do envolvimento dos aminoácidos excitatórios (AAE) no efeito antinociceptivo do EHPP, este foi administrado por via oral e uma hora após, sua atividade foi analisada no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (SANTOS e CALIXTO, 1997; BEIRITH *et al.*, 2002). Também neste modelo, foi avaliada a atividade antinociceptiva dos três compostos isolados da *P. paniculata*, sendo que todos foram administrados por via intraperitoneal, devido a pouca quantidade. A febalosina foi administrada nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg; o aurapten, administrado nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg e a rutina, nas doses de 1, 3, 10, 30 e 100 mg/kg, 30 minutos antes da injeção de glutamato.

Após os tratamentos com o extrato e/ou compostos isolados, os animais receberam 20 µl de solução de glutamato (10 µmol/pata) dissolvido em salina por via intraplantar na pata traseira direita. Após, os animais foram colocados individualmente sob funis de vidro transparentes, e o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado durante 15 minutos e considerado como um índice de nocicepção. Ao fim do experimento, os animais foram sacrificados por

deslocamento cervical e a pata foi cortada na altura da articulação e pesada em balança analítica. A diferença entre a pata que recebeu o agente nociceptivo e a pata que não o recebeu, corresponde ao edema, em mg (FERREIRA *et al.*, 1999; BEIRITH *et al.*, 2002).

Os animais controle receberam igual volume de veículos utilizados para diluir o extrato e compostos.

#### **4.6.5 Teste da retirada da cauda (*tail-flick*)**

A atividade antinociceptiva do EHPP foi analisada no teste da retirada da cauda, também chamado *tail-flick*, descrito previamente por D'Amour e Smith, 1941. O teste do *tail-flick* é um teste simples e de fácil visualização que consiste na utilização de uma fonte de calor como estímulo nociceptivo. Para a realização deste foi utilizado o aparelho *tail-flick* analgesia meter, San Diego instruments. Este aparelho possui um aparato que contém uma fonte térmica luminosa e um suporte para encaixe da cauda do camundongo. No mesmo momento em que a cauda é colocada no aparato, a fonte térmica nociva é acionada e um cronômetro é disparado, sendo que o tempo até a retirada da cauda (período de latência) é utilizado como determinação do índice de nocicepção (Le BARS *et al.*, 2001). Todos animais foram pré-selecionados. Nesta pré-seleção, os animais que permaneceram no aparato, por mais de 8 segundos, foram eliminados do teste. Durante a avaliação da atividade antinociceptiva do extrato, o tempo máximo de permanência permitido aos animais, no aparato, foi de 30 s para evitar danos teciduais.

Os animais foram pré-tratados, por via oral, com o EHPP, na dose de 100 mg/kg, 1 h antes do experimento ou, 30 min antes com morfina (5 mg/kg, s.c.), utilizada como controle positivo. O tempo de permanência dos animais no aparelho de *tail-flick* foi convertido em percentuais, sendo utilizada a seguinte fórmula: percentagem de efeito máximo (PME)=  $\frac{TF - TI}{30 - TI} \times 100$  (tempo final) – TI (tempo basal)/30 – TI (tempo basal).

#### **4.6.6 Efeito sobre desempenho motor no teste de atividade locomotora espontânea**

Com o objetivo de esclarecer a presença de efeito depressor sobre o sistema nervoso central ou periférico dos compostos em estudo, foi empregado o teste de atividade locomotora espontânea, que analisa o desempenho motor do animal. Este teste é realizado em caixas fechadas de 40 x 25 x 20 (Plexiglas cages) equipada com três fotocélulas que são sensíveis à passagem do animal. O número total de vezes que o animal passou em frente à fotocélula, em um tempo de 5 minutos, foi cumulativamente registrado e foi utilizado como indicativo de atividade motora (SKALISZ *et al.*, 2004).

Os animais foram tratados por via oral com o EHPP nas doses de 5, 10, 50 e 100 mg/kg, 1 h antes do teste ou somente com o veículo (salina, 10 ml/kg) utilizados para diluir o extrato, sendo o grupo tratado com o veículo, foi identificado como grupo controle.

#### **4.6.7 Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptivo do EHPP, em camundongos.**

##### **4.6.7.1 Participação do sistema opióide**

Com o objetivo de avaliar a influência do sistema opióide sobre o efeito antinociceptivo do EHPP, grupos distintos de animais foram pré-tratados com o antagonista opióide não seletivo, naloxona (1 mg/kg, i.p.) 20 min antes da administração do EHPP (0,1 mg/kg, v.o.) ou da morfina (5 mg/kg, s.c.), que foi utilizada como controle positivo. Decorridos 1h após a administração por via oral do extrato ou 30 minutos após a administração subcutânea de morfina, foi avaliado o efeito desse tratamento em relação a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Os grupos utilizados como controle foram tratados 1h antes com o EHPP (0,1 mg/kg, v.o.) ou veículo utilizado para diluir o extrato, agonistas e

antagonista (salina, 10 ml/kg, v.o.), ou 30 minutos antes da injeção de glutamato, com a morfina (5 mg/kg, s.c.) ou naloxona (1 mg/kg, i.p.).

#### **4.6.7.2 Participação da via L-arginina-óxido nítrico**

Para avaliarmos também a participação da via da L - arginina - óxido nítrico no efeito antinociceptivo causado pelo EHPP, os animais foram previamente tratados com o precursor do óxido nítrico, a L-arginina (600 mg/kg, i.p.) e após 15 min receberam o EHPP (0,1 mg/kg, v.o.) ou N<sup>ω</sup> – nitro – L - arginina (L-NOARG, 100 mg/kg, i.p.) um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (BEIRITH *et al.*, 1998). Decorridos 1h após a administração do EHPP e 30 min após o tratamento com L-NOARG, os animais foram avaliados quanto a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Os animais controles foram tratados 1h antes da injeção intraplantar de glutamato, com o EHPP (0,1 mg/kg, v.o.) ou com veículo utilizado para diluir o extrato, agonistas e antagonista (salina, 10 ml/kg, v.o.); ou 30 minutos antes da administração, com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou L-NOARG (100 mg/kg, i.p.).

#### **4.6.7.3 Participação do sistema glutamatérgico**

Para verificar se a atividade antinociceptiva da *P. paniculata* está relacionada a uma possível interação com receptores glutamatérgicos, o efeito antinociceptivo do EHPP (1,0 mg/kg, v.o.) e também da rutina (30 mg/kg, i.p.) foi analisado sobre a resposta induzida pela administração intratecal de glutamato (GLU, 175nm/sítio, i.t.), NMDA (450pm/sítio, i.t.) e trans-ACPD (50nm/sítio, i.t.).

As injeções foram administradas nos animais acordados conforme o método descrito por Hylden e Wilcox, 1980. Os animais foram imobilizados manualmente e uma agulha conectada a uma microseringa de 50 µl, foi inserida através da pele entre as vértebras L<sub>5</sub> e L<sub>6</sub>, no espaço subdural. A nocicepção foi induzida pela administração intratecal (no volume de 5 µl) dos aminoácidos excitatórios diluídos em

solução salina. Como controle também foi administrado somente o veículo (salina).

O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo os membros inferiores (patas posteriores, cauda e abdômen) foi cronometrado durante o período de tempo padronizado para cada AAE, após sua administração, (glutamato: 3 min; NMDA: 5 min e trans-ACPD: 15 min). Este tempo foi considerado como índice de nocicepção, conforme descrito previamente (FERREIRA *et al.*, 1999; SCHEIDT *et al.*, 2002).

#### **4.6.7.4 Participação de citocinas como a IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$**

Tanto a IL-1 $\beta$  quanto o TNF- $\alpha$  contribuem diretamente na perpetuação da dor associada a processos inflamatórios como a hiperalgesia e alodínia (FERREIRA *et al.*, 1988; DAVIS e PERKINS, 1994, CUNHA e FERREIRA, 2003, COUTAUX *et al.*, 2005). Com base nestas informações, decidiu-se avaliar o efeito antinociceptivo do EHPP (0,1 mg/kg, v.o.) e de seu composto isolado rotina (30mg/kg, i.p.) na nocicepção induzida pela administração intratecal destas citocinas. Os animais receberam uma injeção intratecal de 5  $\mu$ l de IL-1 $\beta$  (1pg/sítio, i.t.), TNF- $\alpha$  (0,1pg/sítio, i.t.) ou das soluções veículo usadas para diluir extrato (salina) e compostos (salina e tween). As injeções foram administradas nos animais acordados conforme o método descrito por Wilcox em 1980. Os animais foram imobilizados manualmente e com uma agulha conectada a uma microseringa de 50  $\mu$ l, que foi inserida através da pele entre as vértebras L<sub>5</sub> e L<sub>6</sub> dentro do espaço subdural, foram administradas as soluções.

O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo os membros inferiores, após a injeção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi cronometrado por um período de 15 min, sendo utilizado para determinar o índice de nocicepção, conforme descrito previamente (FERREIRA *et al.*, 1999; SCHEIDT *et al.*, 2002).

## **4.7 Estudo da atividade antiinflamatória do EHPP**

### **4.7.1 Avaliação da atividade antiinflamatória do EHPP no modelo do edema de pata induzido injeção intraplantar de carragenina, em ratos**

O modelo de edema em pata de rato foi realizado de acordo com Winter, 1962. O volume da pata direita e esquerda dos animais foi avaliado por pletismometria. Em seguida, os animais receberam o tratamento com EHPP, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (v.o.), indometacina (4 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina, 10 ml/Kg, v.o) e após 60 e 30 min.respectivamente, receberam uma injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata) na pata posterior direita e salina na pata posterior esquerda no volume de 50 µl. Os volumes das patas traseiras direita e esquerda foram avaliados novamente por pletismometria após 1, 2, 3 e 4 h. Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume final da pata a cada tempo ( $V_f$ ) e o volume inicial ( $V_i$ ), representados pela fórmula  $V_f - V_i$ .

### **4.7.2 Avaliação da atividade antiinflamatória do EHPP no modelo de pleurisia, induzido pela injeção intrapleural de carragenina, em camundongos**

Para indução experimental da pleurisia, primeiramente foi administrado por via endovenosa a solução de Azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 ml i.v.), para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural (SALEH, 1997; VIANNA e CALIXTO, 1998). Decorridos 30 min da injeção de Azul de Evans, grupos de animais foram tratados com EHPP (3, 10, 30 mg/kg, v.o.). Após 1 hora do tratamento, os mesmos foram levemente anestesiados com éter etílico e em seguida foi administrado na cavidade pleural direita, através do espaço intercostal, 0,1 ml de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) contendo, carragenina (1%), ou somente salina (grupo controle). Quatro horas após a administração do agente flogístico, os animais foram mortos com uma overdose de éter etílico. A seguir os animais foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30 a 45°, sendo feita uma incisão



transversal na pele e nos músculos abdominais. Em seguida o apêndice xifóide foi pinçado e através de uma incisão abaixo do esterno, os pulmões e a cavidade pleural foram expostos. Logo após esta operação, a cavidade pleural foi lavada com 1,0 mL de solução salina heparinizada (20 UI/ ml). A seguir, o volume líquido da cavidade pleural foi coletado com auxílio de pipetas automáticas e processado para posterior determinação do número total e diferencial de células e da exsudação.

A contagem total foi realizada utilizando-se a câmara de Neubauer espelhada e microscópio óptico (aumento de 400 vezes), com uma prévia diluição de 10 µl do exsudato em 200 µl do líquido de Türk (2% de ácido acético).

A contagem diferencial foi efetuada, realizando-se a leitura das amostras de exsudato fixadas em 3% de albumina bovina, sendo secados à temperatura ambiente e corados pelo método de May-Grunwald-Giensa. A contagem diferencial foi feita em microscópio óptico comum com auxílio de objetiva de imersão, contando-se aproximadamente 100 células por lâmina.

Após a lavagem das cavidades pleurais com solução salina heparinizada, uma alíquota de 1 ml foi separada e congelada em freezer (-20°C) para posterior determinação dos níveis de Azul de Evans em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech – Ultrospec 2000) por leitura de densidade óptica, em comprimento de onda de 600 nm. Para tal, curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas do corante também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores experimentais em µg/ml com auxílio de equação da reta.

## **4.8 Estudo da atividade antiúlcero gênica e anti-secretora ácida do EHPP, em ratas**

### **4.8.1 Lesões gástricas induzidas por etanol**

Este modelo foi descrito por Robert e colaboradores (1979) e nele, as lesões da mucosa gástrica ocorrem independente de qualquer efeito sobre a secreção

gástrica, sendo que a lesão se caracteriza pela presença de focos hiperêmicos e hemorrágicos indicando o comprometimento do fluxo sangüíneo pelo agente lesivo.

Para testar a hipótese de uma possível atividade protetora gástrica do EHPP, o mesmo foi administrado em ratas Wistar adultas, em jejum de 15-18 horas, por via oral, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, e por via intraperitoneal, nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg. Uma hora depois da administração do etanol 70% (0,5 ml/ animal, v.o.), os animais foram mortos e a parede abdominal foi exposta e o estômago foi localizado e removido.

Após a remoção do estômago, o mesmo foi mantido em placa de Petri, lavado e aberto ao longo da curvatura menor. O conteúdo gástrico foi desprezado, a mucosa foi lavada delicadamente com água destilada e esticada em placa de isopor. Depois deste procedimento, o índice de úlceras foi determinado através de “leitura cega” de acordo com a tabela de pontuação para lesões gástricas agudas como descrito no item 4.8.3.1.

#### **4.8.2 Lesões gástricas induzidas por indometacina**

O modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina foi conduzido de acordo com Djahanguiri, 1969. Nele, as úlceras são induzidas através da inibição da síntese de prostaglandinas, cuja função fisiológica é estimular a secreção de muco e bicarbonato e inibir a secreção gástrica.

Para testar a atividade protetora gástrica do EHPP, o extrato foi administrado por via oral nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, em ratas Wistar adultas, 1 hora antes de iniciar os outros tratamentos.

Os animais, em jejum de 15-18 horas, foram tratados com água e extrato, por gavagem (via oral). Após uma hora do pré-tratamento, foi administrado indometacina 20 mg/Kg, por via subcutânea. Seis horas após a administração do antiinflamatório, os animais foram sacrificados e a parede abdominal foi exposta e o estômago foi localizado e removido.

Após a remoção do estômago, o mesmo foi mantido em placa de Petri, lavado e aberto ao longo da curvatura menor. O conteúdo gástrico foi desprezado, a mucosa

foi lavada delicadamente com água destilada e esticada em placa de isopor. Depois deste procedimento, o índice de úlceras foi determinado em “leitura cega”, de acordo com a tabela de pontuação para lesões gástricas agudas, como descrito no item 4.8.3.1..

#### **4.8.3 Avaliação das lesões gástricas nos modelos de indução aguda**

**4.8.3.1 Determinação do índice de úlceras:** O índice de úlceras foi determinado de acordo com Mesia, 1998, por contagem direta das lesões menores ou iguais a 1 mm (1 ponto). Quando maiores, o comprimento de cada lesão na mucosa glandular foi medido e quantificado, considerando 1,5 pontos x mm. No caso de úlceras perfuradas, estas também foram medidas e cada mm de lesão e multiplicado por 5 pontos (5 pontos x mm)

#### **4.8.3.2 Quantificação do muco gástrico**

Após a realização do modelo de lesão gástrica por etanol, foi realizada a quantificação do muco gástrico. Neste modelo, segmentos úmidos da mucosa gástrica (exatamente pesados), foram incubados em 10 ml de solução da Alcian Blue 0,1%, onde permaneceram corando por duas horas. O excesso de Alcian Blue foi removido com sacarose 0,25 mol/L (duas lavadas sucessivas, a primeira por 15 minutos e a segunda durante 45 minutos). O corante complexado com o muco da parede glandular foi extraído com 5 ml de cloreto de magnésio (0,5 mol/L), agitando-se intermitentemente, cada segmento, por 1 minuto, a cada 30 minutos durante duas horas. Foi misturada 3 ml da solução sobrenadante azul, obtida com 3 ml de éter dietílico e agitado vigorosamente até a formação de uma emulsão. Centrifugou-se a 3600 rpm x 10 min., para separar a fase aquosa, descartando o resíduo. A concentração de Alcian Blue, nas amostras, foi determinada por leitura espectrométrica a 598 nm (CORNE *et al*, 1974). Para tal, curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas do corante também tiveram suas densidades

óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores experimentais em  $\mu\text{g}$  de Alcian Blue/ml/g de tecido úmido, através da interpolação na curva padrão do corante

#### **4.8.4 Método de estudo *in vivo*: Método da ligadura pilórica**

Este modelo foi conduzido de acordo com o descrito por Shay *et al*, 1945. O modelo da ligadura pilórica nos permite estudar o efeito da drogas sobre a secreção gástrica, bem como sobre eventos envolvidos na gastroproteção. Neste método, o conteúdo gástrico, acumulado durante 4 horas, foi avaliado em termos de volume secretado, pH, acidez total e atividade péptica. Com o objetivo de descartar efeitos inespecíficos que interferem com a secreção, como o estímulo reflexo de secreção gástrica pelo contato direto de um extrato vegetal com terminações nervosas sensitivas peritoneais, deu-se preferência à via de administração intraduodenal porque, além de ser protegida pela mucosa, é a que mais se aproxima da via oral.

Para fazer a ligadura no piloro, os ratos em jejum (15-18 horas) foram anestesiados com éter e fixados em decúbito dorsal em uma placa de isopor. Através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, o estômago foi localizado e o piloro foi amarrado com linha cordonê. Após este procedimento, foi administrado o veículo: água (10 ml/Kg) pela via intraduodenal nos animais controle. A cimetidina 60 mg/kg e o EHPP nas concentrações de 30, 100 e 300 mg/kg foram administrados por via intraduodenal.

Depois deste procedimento a parede abdominal e a pele foram suturadas e foi aguardada a recuperação da anestesia. Quatro horas após a cirurgia, os animais foram mortos e seus estômagos foram removidos após pinçamento do esôfago para evitar perda do material secretado.

Depois da retirada do estômago, o órgão foi lavado com água destilada, secado com gaze e mantido em placa de Petri. O estômago foi aberto ao longo da curvatura menor e a mucosa foi lavada com 3 ml de água destilada, recolhendo, a seguir, o suco gástrico em tubos de ensaios. Os tubos foram centrifugados (1500 rpm x 30 min. em centrífuga refrigerada), sendo o volume determinado por medida

direta em provetas e a acidez total (mEq  $[H^+]$ /ml/4h) foi determinada por titulação com NaOH 0,1N utilizando solução de fenoftaleína 2% como indicador da neutralização.

#### **4.8.5 Estudo dos mecanismos de ação envolvidos no possível efeito protetor gástrico do EHPP, em ratas**

Com o objetivo de avaliar a participação do óxido nítrico no mecanismo de ação envolvido na atividade protetora gástrica do EHPP, observada no modelo de úlceras agudas induzidas por etanol, os animais foram previamente tratados com o inibidor da óxido nítrico sintase, L-NAME (70 mg/kg, i.p.) e após 30 minutos receberam o EHPP (100 mg/kg, v.o.). Após 1h, foi administrado por gavagem 0,5 ml de etanol 70% para cada animal; 1h depois da administração do etanol, os animais foram sacrificados e a parede abdominal foi exposta e o estômago foi localizado e removido (ARRIETA *et al*, 2003).

O pré-tratamento com L-NAME modifica as características da úlcera induzida pelo etanol, aumentando o tamanho da lesão e tornando-a mais larga. Dessa forma, para aumentar a reprodutibilidade da leitura do índice de úlceras, o mesmo foi determinado de forma diferente do descrito no item 4.8.3.1., através da leitura da área lesada, onde a largura da lesão foi medida e multiplicada pelo seu comprimento. A concentração de muco, secretado pela mucosa gástrica, foi quantificada como descrito no item 4.8.3.2..

#### **4.8.6 Avaliação do EHPP sobre a motilidade gastrointestinal**

##### **4.8.6.1 Trânsito intestinal, em camundongos**

Esse método consiste na administração de um marcador colorido (vermelho de fenol 0,05% em carboximetilcelulose 1,5%) e na avaliação do trajeto do mesmo no intestino delgado durante um período de tempo. Camundongos, em jejum de 6

horas, foram tratados com o veículo (grupo C: controle, água, via oral), ou com metoclopramida 30 mg/kg v.o., ou com atropina 3,0 mg/kg, s.c. ou com EHPP (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.). Decorrido 1 h dos tratamentos, foi administrado o marcador colorido, por via oral a todos os animais. O grupo controle tempo zero foi morto, por deslocamento cervical, logo após a administração do marcador colorido e os outros grupos, após 20 min. da administração. A cavidade abdominal foi aberta e o intestino delgado foi removido. Com auxílio de uma régua, foi medido o comprimento total do intestino delgado de cada animal desde o piloro até a válvula ileocecal, bem como a distância percorrida pelo marcador. Os resultados destas medidas foram expressos em porcentagem de distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado (SCARPIGNATO *et al*, 1980).

#### **4.8.6.2 Esvaziamento gástrico de semi-sólidos**

Esse método consiste na administração de um marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,05% em carboximetilcelulose 1,5%) e na avaliação da quantidade do marcador que permanece no estômago durante um período de tempo. Camundongos, em jejum de 6 horas, foram tratados com o veículo (grupo C: controle, água, via oral), ou com metoclopramida 30 mg/kg v.o., ou com atropina 3,0 mg/kg, s.c. ou com EHPP (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.). O grupo controle tempo zero foi sacrificado, por deslocamento cervical, logo após a administração do marcador colorido, e os outros grupos, após 20 min. da administração. A cavidade abdominal foi aberta, o piloro e a parte distal do esôfago foram pinçados, o estômago retirado com seu conteúdo e então aberto e lavado com 7ml de água destilada. O conteúdo gástrico coletado foi centrifugado a 1.500 (r.p.m.), por 15 min. Foi coletado 1 ml do sobrenadante, no qual foi adicionado 1 ml de NaOH 1N (pH 12). Os resultados foram obtidos por leitura espectrofotométrica a 560nm, e expressos em porcentagem de esvaziamento gástrico em relação ao grupo controle tempo zero (SCARPIGNATO *et al* , 1980).

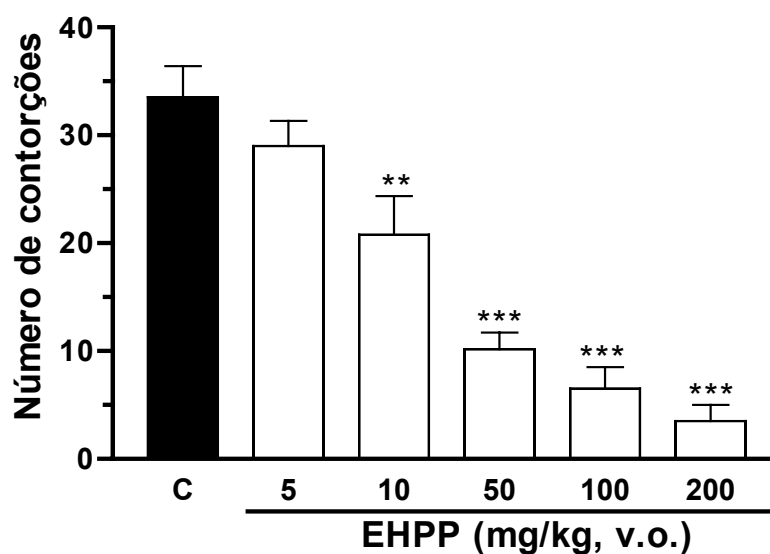
#### 4.9 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média, exceto as  $DI_{50}$ s (dose ou concentração das drogas ou compostos que reduziram a resposta em 50% em relação ao grupo controle), que são apresentadas como médias geométricas, acompanhadas de seus respectivos limites de confiança, em nível de 95%. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de múltipla comparação, utilizando-se o método de Newman Keuls, quando apropriado. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados como indicativos de significância. As  $DI_{50}$ s foram estimadas a partir de experimentos individuais, utilizando o método de regressão linear através do programa “Graph Pad” ou “Instat”.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) em camundongos

A Figura 5 mostra que o EHPP (5, 10, 50, 100 e 200 mg/kg), administrado por via oral, foi capaz de reduzir, de forma dependente da dose, as contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos. O valor médio da  $DI_{50}$  (juntamente com seus limites de confiança de 95%) foi de 24,8 (18,3 - 33,5) mg/kg, apresentando inibição de  $90 \pm 4\%$  na dose de 200 mg/kg.

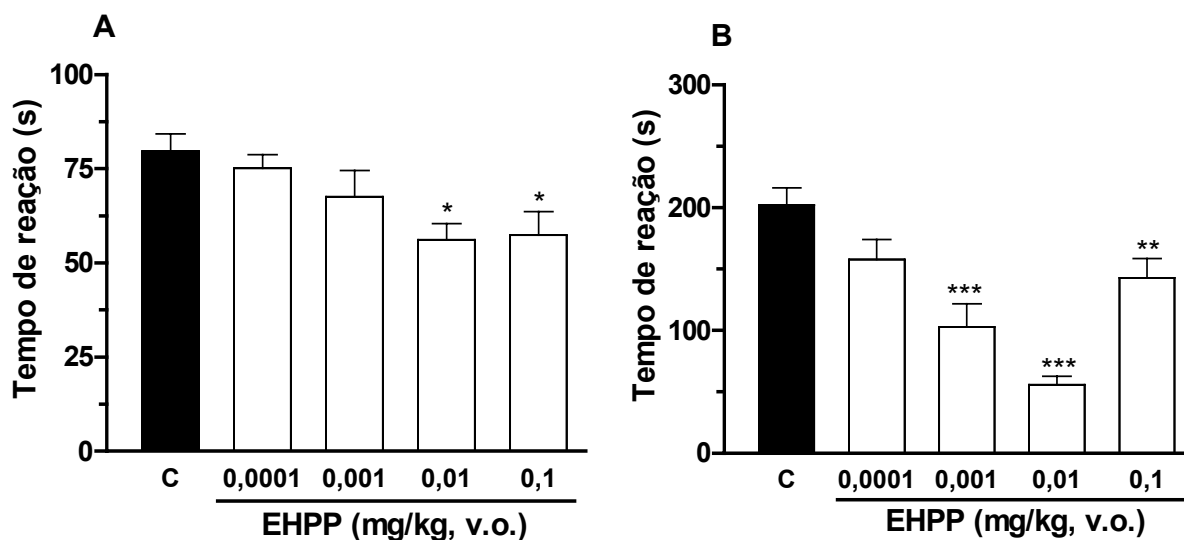


**Figura 5:** Efeito do EHPP sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético, em camundongos. Os animais foram tratados com o extrato (barras abertas) ou veículo (C, barra fechada), 1h antes por via oral, nas doses indicadas e após este período, receberam uma injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% e o número de contorções abdominais foi avaliado durante 20 min. Cada grupo representa a média de 6 -12 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística, foi considerado significativo \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  quando comparado ao grupo controle (C).



## 5.2 Nociceção induzida pela administração intraplantar de formalina (2,5%) em camundongos

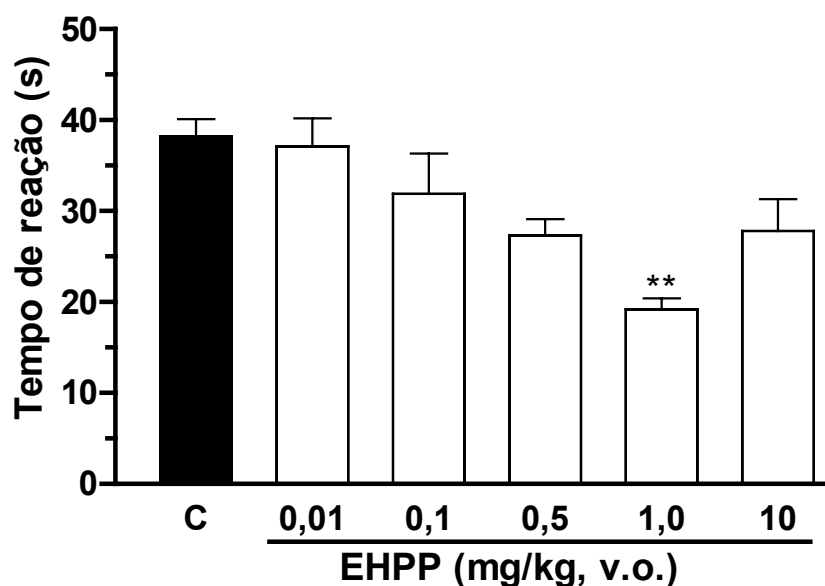
A Figura 6 mostra que o EHPP (0,0001-0,1 mg/kg), administrado por v.o., foi capaz de inibir de forma parcial a nociceção de origem neurogênica (1ª fase – Figura 6A) com inibição de  $24 \pm 6\%$ , na dose de 0,01 mg/kg, sendo mais eficaz em reduzir a nociceção inflamatória (2ª fase – Figura 6B) com valor médio de  $DI_{50}$  de 4,2 (3,5-4,9)  $\mu\text{g/kg}$  e inibição de  $69 \pm 4\%$ , na dose de 0,01 mg/kg. No entanto, o tratamento com o extrato não apresentou efeito sobre o edema de pata causado pela injeção intraplantar de formalina (dado não apresentado).



**Figura 6:** Efeito do EHPP sobre a nociceção, induzida pela formalina, em camundongos. Os animais foram tratados com o extrato (barras abertas) ou veículo (controle: C, barra fechada), 1h antes por via oral, nas doses indicadas e após este período receberam uma injeção intraplantar de formalina 2,5% e a nociceção foi avaliada na primeira (A) e segunda fase (B). Cada grupo representa a média de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística, foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e significativo \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  quando comparado ao grupo controle (C).

### 5.3 Nocicepção induzida pela administração intraplantar de capsaicina (1,6µg/pata) em camundongos

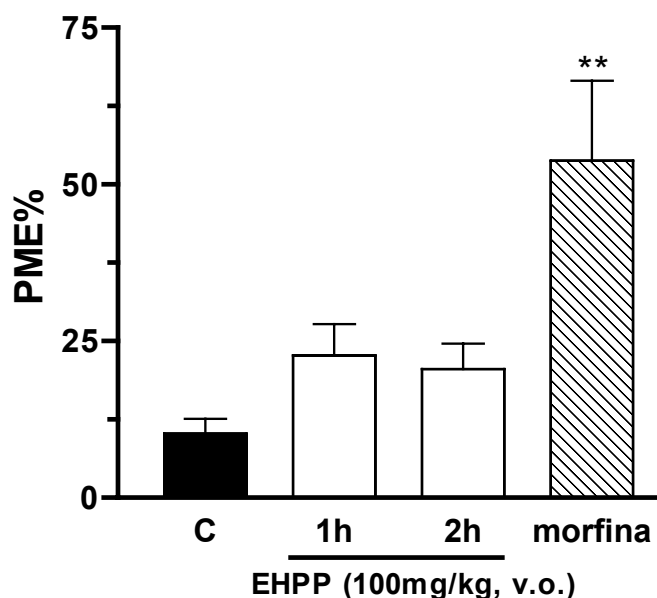
O resultado apresentado na Figura 7 mostra que o EHPP (0,01-10 mg/kg), administrado por v.o., foi capaz de inibir de maneira significativa a nocicepção de origem neurogênica causada pela capsaicina, somente na dose de 1,0 mg/kg com inibição de  $50 \pm 3\%$ .



**Figura 7:** Efeito do EHPP sobre a nocicepção induzida pela capsaicina, em camundongos. Os animais foram tratados com o extrato (barras abertas) ou veículo (C, barra fechada), 1h antes por via oral, nas doses indicadas e após este período receberam a injeção intraplantar de capsaicina e a nocicepção foi avaliada. Cada grupo representa a média de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e significativo  $**P < 0,01$  quando comparado ao grupo controle (C).

#### 5.4 Efeito do EHPP no teste da retirada da cauda (*tail-flick*), em camundongos

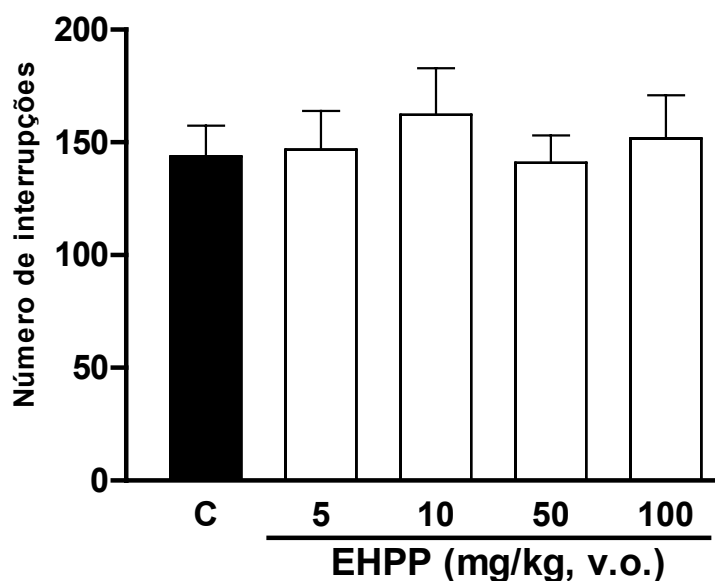
O resultado na Figura 8 mostra que o EHPP (100 mg/kg, 1h antes), administrado por via oral, não foi capaz de alterar o período de latência ao estímulo térmico luminoso, quando analisado no teste do *tail-flick*, após 1 e 2 hs da sua administração por via oral. Porém, o tratamento com morfina (agonista opióide, 5 mg/kg, s.c.) aumentou o período de latência de resposta dos animais ao estímulo térmico quando avaliada por este modelo.



**Figura 8:** Efeito do EHPP e da morfina sobre latência ao estímulo térmico nocivo aplicado no teste da retirada da cauda (*tail-flick*), em camundongos. Os animais foram tratados com o extrato (barra aberta) ou veículo (C, barra fechada), 1h antes por via oral ou morfina (barra hachurada, 5mg/kg, s.c.) 30 min. antes, nas doses indicadas e após, a latência ao estímulo térmico foi avaliada. Cada grupo representa a média de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística, foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e significativo  $**P < 0,01$ , quando comparado ao grupo controle (C).

### 5.5 Efeito do EHPP sobre a performance motora no teste de atividade locomotora espontânea, em camundongos

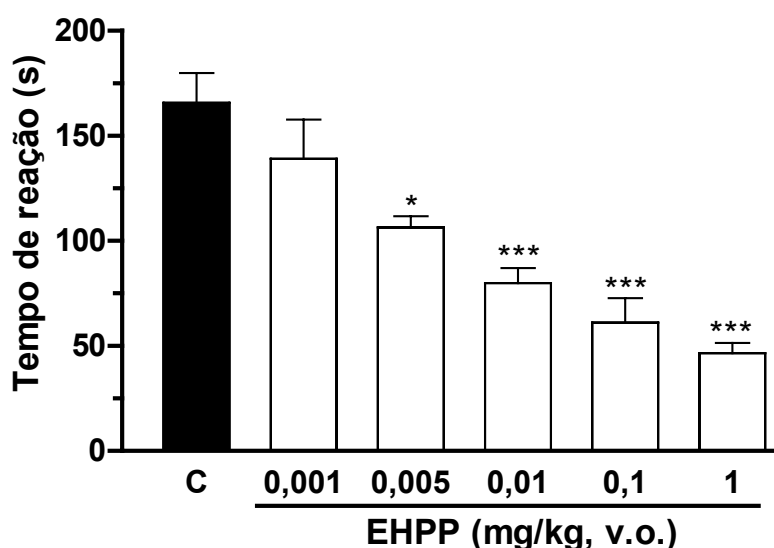
A Figura 9 demonstra que o tratamento com o EHPP (5-100 mg/kg, v.o.), 1 hora antes, não alterou de maneira significativa a atividade locomotora dos animais quando avaliados no modelo da caixa de atividade locomotora, quando comparado ao grupo controle, que corresponde aos animais tratados somente com o veículo (salina).



**Figura 9:** Efeito do tratamento dos animais com EHPP sobre o desempenho motor, em camundongos. Os animais foram tratados com o extrato (barras abertas) ou veículo (C, barra fechada), 1h antes por via oral, nas doses indicadas e após, a atividade locomotora foi avaliada. Cada grupo representa a média de reação de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística, foi considerado não significativo  $P > 0,05$  quando comparado ao grupo controle (C).

### 5.6 Efeito do EHPP e dos compostos isolados, febalosina, aurapten e rutina sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato, em camundongos

Os resultados apresentados na Figura 10 mostram que o EHPP (0,001 – 1,0 mg/kg), administrado por via oral, causou uma inibição de forma dose dependente, da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (10 $\mu$ mol/pata) em camundongos, porém sem interferir com o edema produzido pela mesma (dado não apresentado). O valor médio da  $DI_{50}$  (juntamente com seus limites de confiança de 95%) foi de 8,4 (7,7 – 9,2)  $\mu$ g/kg, apresentando inibição de  $72 \pm 3\%$  para a dose de 1,0 mg/kg.

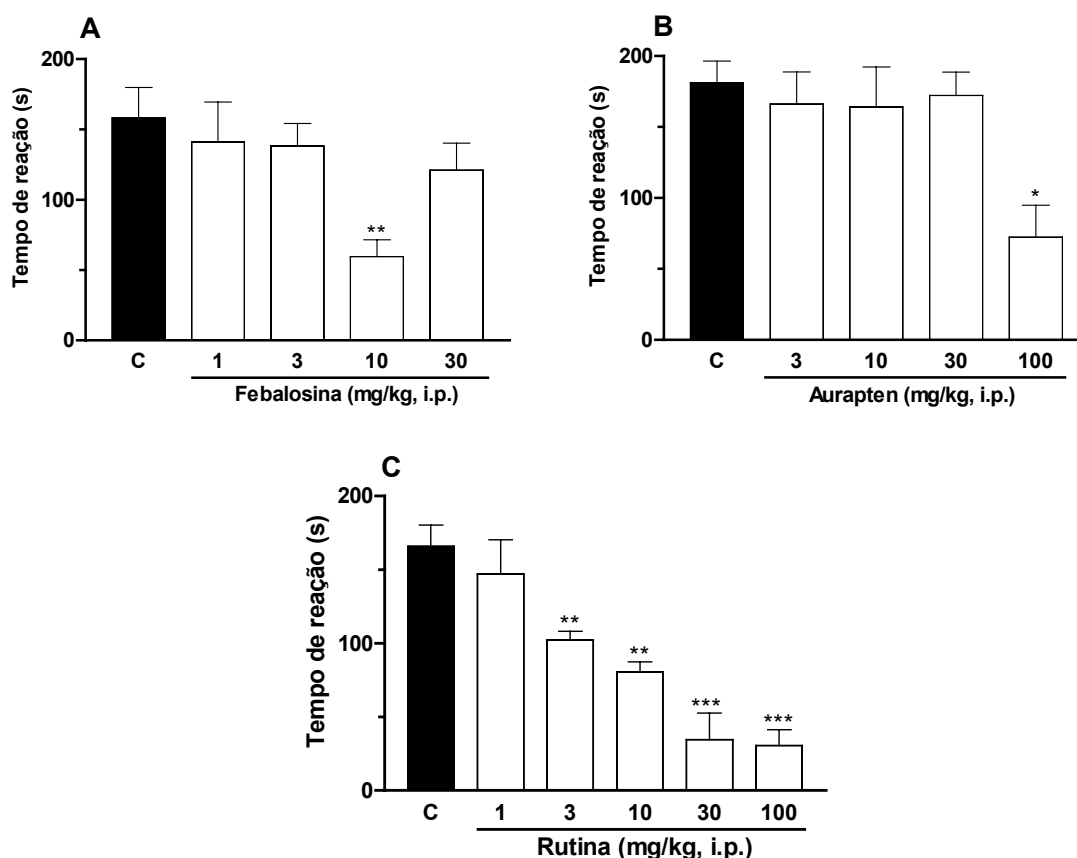


**Figura 10:** Efeito do EHPP na nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato, em camundongos. Os animais foram tratados com o extrato (barras abertas) ou veículo (C, barra fechada), 1h antes por via oral nas doses indicadas e após a nocicepção foi avaliada. Cada grupo representa a média de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M.. Na análise estatística foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e  $*P < 0,05$ ;  $***P < 0,001$ , significativo quando comparado ao grupo controle (C).

De forma a complementar, aos dados obtidos com o EHPP, a atividade antinociceptiva dos compostos isolados febalosina (1-30 mg/kg, i.p.), aurapten (3-100 mg/kg, i.p.) e rutina (1-100 mg/kg, i.p.), foram testados no modelo de nocicepção

induzida pelo glutamato. A Figura 11 C, mostra que o rutina apresentou, de forma dependente da dose, uma importante atividade antinociceptiva, com inibição de  $82 \pm 7\%$ , para a dose de 100 mg/kg e valor médio da  $DI_{50}$  (juntamente com seus limites de confiança de 95%) de 10,98 (7,80-15,45) mg/kg.

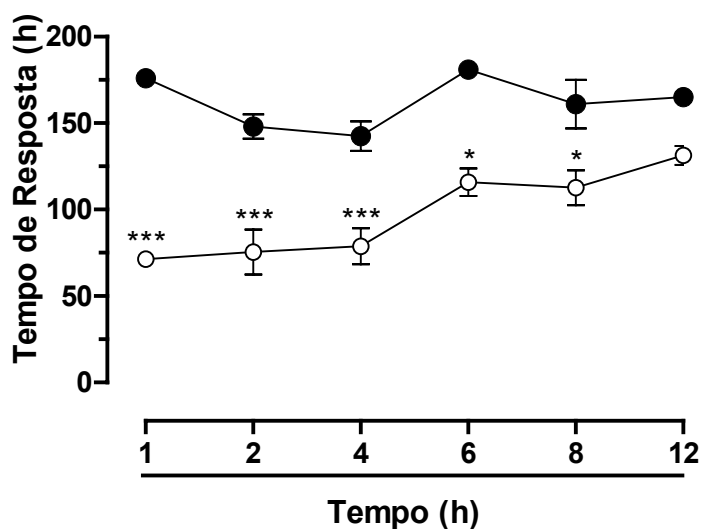
No entanto, a febalosina (Fig. 11 A) apresentou atividade antinociceptiva somente na dose de 10 mg/kg, i.p., com inibição de  $64 \pm 12\%$ . O mesmo ocorreu com o aurapten (Fig. 11 B), que apresentou efeito inibitório somente na dose de 100 mg/kg, com inibição de  $71 \pm 7\%$ .



**Figura 11:** Efeito da febalosina (A), aurapten (B) e rutina (C) em relação a nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato, em camundongos. Os animais foram tratados com os compostos (barras abertas) ou veículo (C, barra fechada), 30 minutos antes por via intraperitoneal nas doses indicadas e após a nocicepção foi avaliada. Cada grupo representa a média de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M.. Na análise estatística foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , significativo quando comparado ao grupo controle (C).

### 5.7 Curva tempo-resposta do EHPP no modelo de nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato (10 $\mu$ mol/ pata), em camundongos

A Figura 12 mostra que o EHPP, quando administrado na dose de 0,1 mg/kg, por via oral, 1 hora antes, foi capaz de inibir significativamente a nocicepção causada pela injeção intraplantar de glutamato. Os resultados demonstram que a atividade antinociceptiva do extrato foi mantida até a oitava hora, sendo mais pronunciada da primeira a quarta hora.

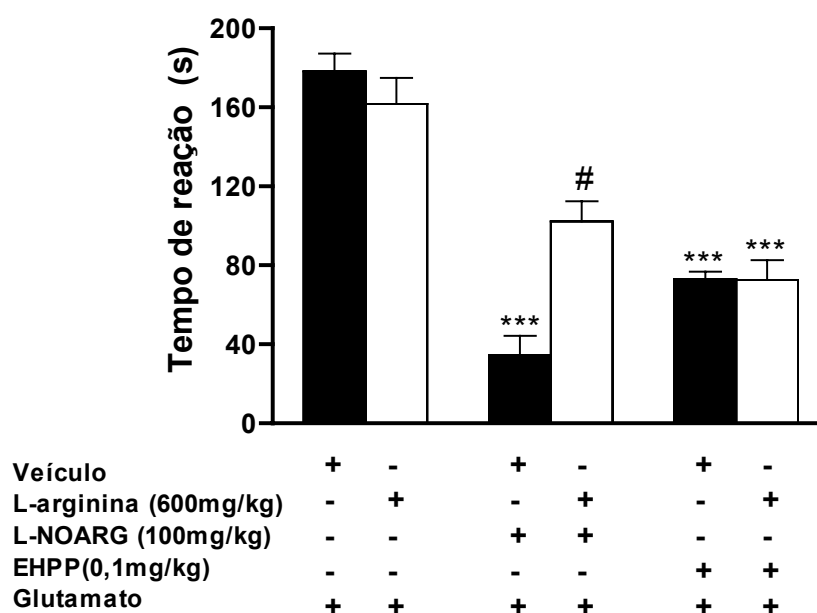


**Figura 12:** Curva tempo-resposta do EHPP no modelo de nocicepção induzido pela administração intraplantar de glutamato, em camundongos. Os animais foram tratados com o extrato (círculos abertos) ou veículo (C, círculos fechados), 1h antes por via oral, na dose de 0,1mg/kg e após o efeito antinociceptivo tempo-resposta foi avaliado. Cada grupo representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 -12 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e  $*P < 0,05$ ;  $***P < 0,001$ , significativo quando comparado ao grupo controle (C).

## 5.8 Análise do mecanismo de ação do EHPP

### 5.8.1 Efeito do pré-tratamento com L-arginina

A Figura 13 demonstra que o pré-tratamento dos animais com L-arginina, (substrato da óxido nítrico sintase, 600mg/kg, i.p.), reverteu a ação antinociceptiva causada pela administração da L-NOARG (inibidor da óxido nítrico sintase, 75 mg/kg, i.p.). Porém, o tratamento com a L-arginina não interferiu de forma significativa com a atividade antinociceptiva causada pelo EHPP (0,1 mg/kg, v.o.), quando analisada em relação a nocicepção induzida pelo glutamato.

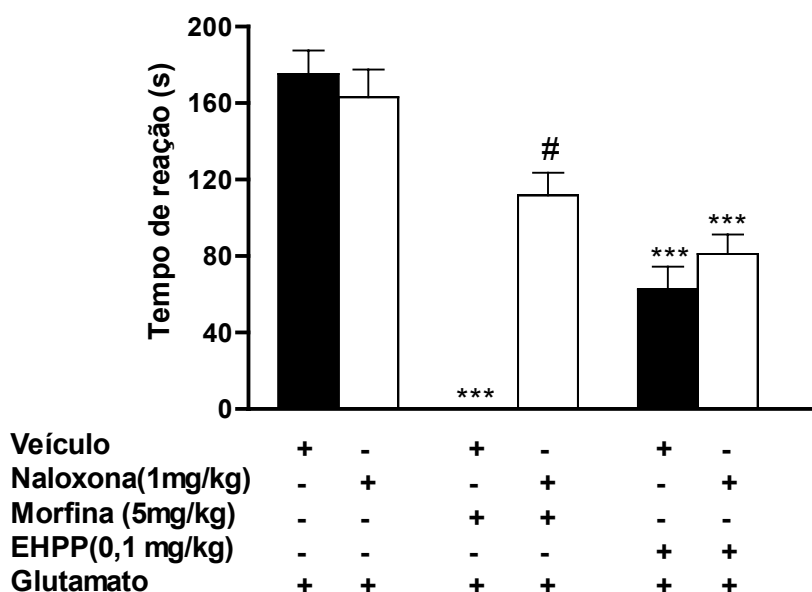


**Figura 13:** Efeito do pré-tratamento com L-arginina (600mg/kg, i.p.) sobre a antinocicepção causada pelo EHPP (0,1 mg/kg; 1h antes) por via oral ou pela L-NOARG (100mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística, foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e  $***P < 0,001$ , significativo quando comparado aos grupos pré-tratados com controle e antagonista (veículo + glutamato e L-arginina + glutamato) e #  $P < 0,001$  difere significativamente do grupo tratado com L-NOARG e glutamato.



### 5.8.2 Participação do sistema opióide

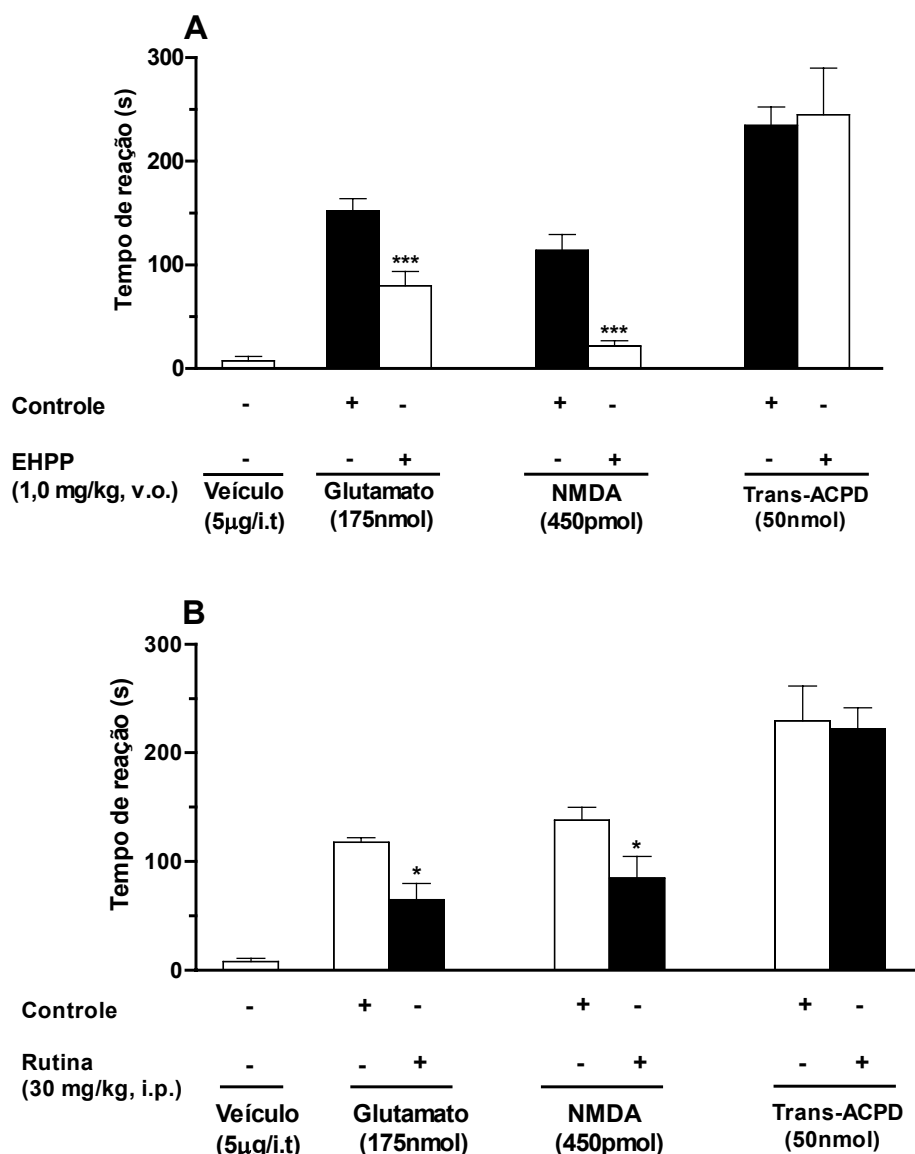
O resultado apresentado na Figura 14 mostra que pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p.) reverteu a ação antinociceptiva causada pela administração da morfina (5 mg/kg, s.c.). No entanto, o tratamento com a naloxona não interferiu com a antinocicepção causada pelo EHPP (0,1 mg/kg, v.o.), quando analisada em relação a nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato.



**Figura 14:** Efeito do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p.) sobre a antinocicepção causada pelo EHPP (0,1 mg/kg; 1h antes) por via oral ou pela morfina (5 mg/kg, s.c.) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 – 12 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística, foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e  $***P < 0,001$  significativo quando comparado ao grupo pré-tratado com controle e antagonistas (veículo + glutamato e naloxona + glutamato) e  $\#P < 0,001$  difere significativamente do grupo tratado com morfina + glutamato.

### **5.8.3 Efeito do EHPP e da rutina sobre a nocicepção causada pela injeção intratecal de aminoácidos excitatórios (AAE), em camundongos**

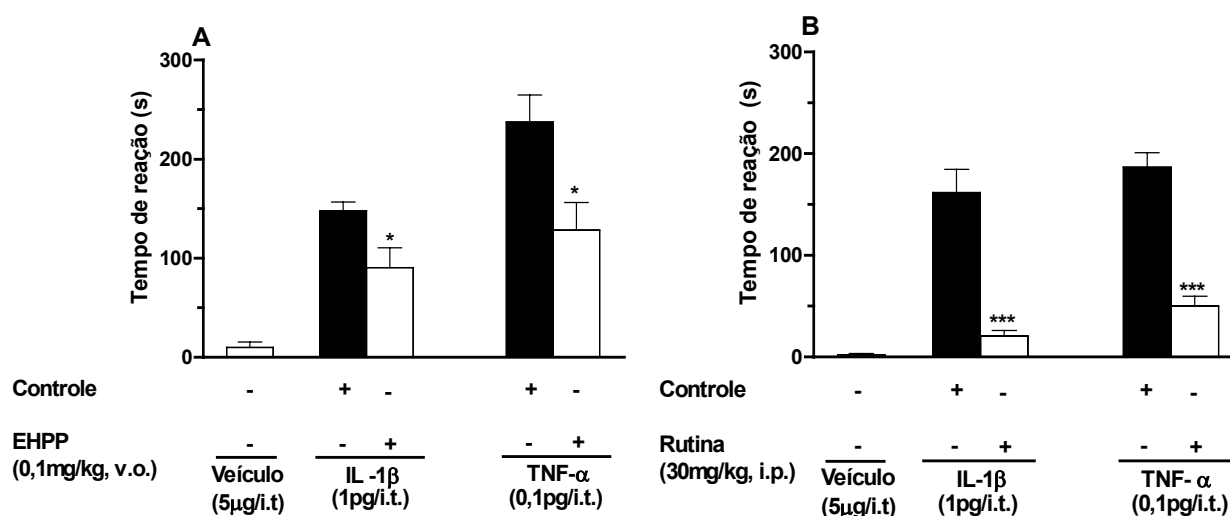
Os dados apresentados na Figura 15 (A e B) demonstram que tanto o EHPP (1,0 mg/kg, v.o., 1 hora antes), quanto a rutina (30 mg/kg, i.p., 30 min. antes) foram capazes de reverter de forma significativa a nocicepção causada pela administração intratecal de glutamato (175 nmol/sítio) e NMDA (450 pmol/sítio) com inibições de  $48 \pm 9\%$  e de  $81 \pm 5\%$ , respectivamente para o EHPP e  $45 \pm 13\%$  e de  $39 \pm 15\%$ , respectivamente para a rutina. No entanto, o EHPP e a rutina não interferiram na nocicepção induzida pelo trans-ACPD (50nmol/sítio).



**Figura 15:** Efeito antinociceptivo do EHPP (A) e da rutina (B), em relação a nocicepção induzida pela administração intratecal de glutamato (175 nmol), NMDA (450 pmol) e trans-ACPD (50 nmol), em camundongos. Os animais foram tratados com o EHPP ou rutina (barras abertas) ou veículo (C, barras fechadas), 1h antes, v.o. ou 30 min. antes, i.p. nas doses indicadas, respectivamente e após a nocicepção foi avaliada. Cada grupo representa a média de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M.. Na análise estatística, foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e  $*P < 0,05$ ,  $***P < 0,001$ , significativo quando comparado com o grupo controle.

#### 5.8.4 Efeito do EHPP e da rutina sobre a nocicepção causada pela injeção intratecal de IL-1 $\beta$ (1 pg) e TNF- $\alpha$ (0,1 pg), em camundongos

A Figura 16 (A e B) mostra o efeito nociceptivo induzido pela administração intratecal de IL-1 $\beta$  (1pg) e TNF- $\alpha$  (0,1pg). Tanto o EHPP (0,1 mg/kg, v.o., 1 hora antes), quanto a rutina (30 mg/kg, i.p., 30 min. antes) foram capazes de reduzir de maneira significativa a nocicepção causada pela IL-1 $\beta$  e pelo TNF- $\alpha$ , com inibição de  $59 \pm 14\%$  e  $46 \pm 12\%$ , respectivamente para o EHPP e de  $87 \pm 3\%$  e de  $73 \pm 5\%$ , respectivamente para a rutina.

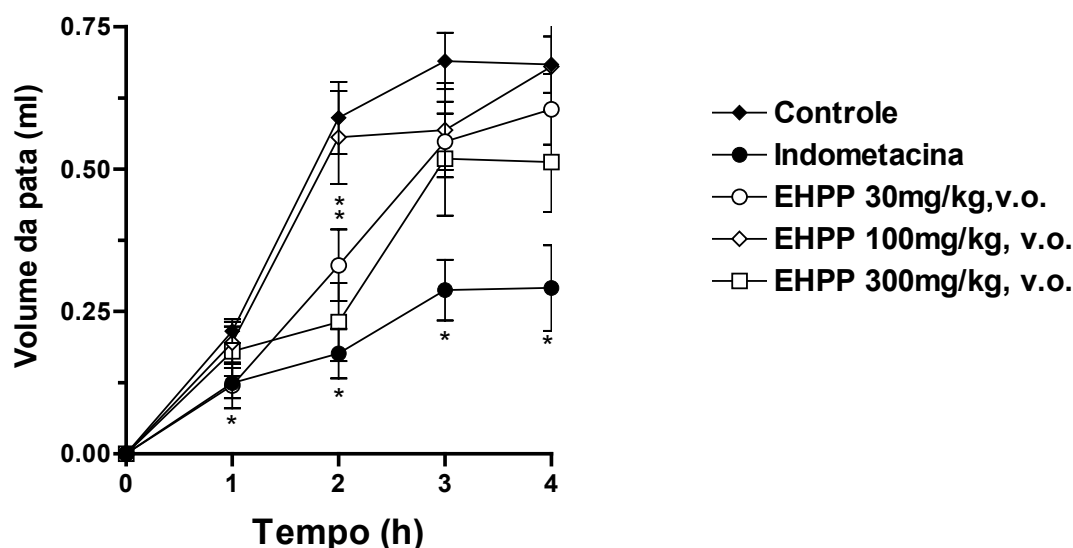


**Figura 16:** Efeito antinociceptivo do EHPP (A) e da rutina (B), em relação a nocicepção induzida pela injeção intratecal de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , em camundongos. Os animais foram tratados com o EHPP ou rutina (barras abertas) ou veículo (C, barras fechadas), 1h antes, v.o. ou 30 min. antes, i.p. nas doses indicadas, respectivamente e após a nocicepção foi avaliada. Cada grupo representa a média de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M.. Na análise estatística, foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e  $*P < 0,05$ ; significativo quando comparado ao grupo controle.

## 5.9 Atividade antiinflamatória do EHPP

### 5.9.1 Efeito do EHPP no edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, em ratos

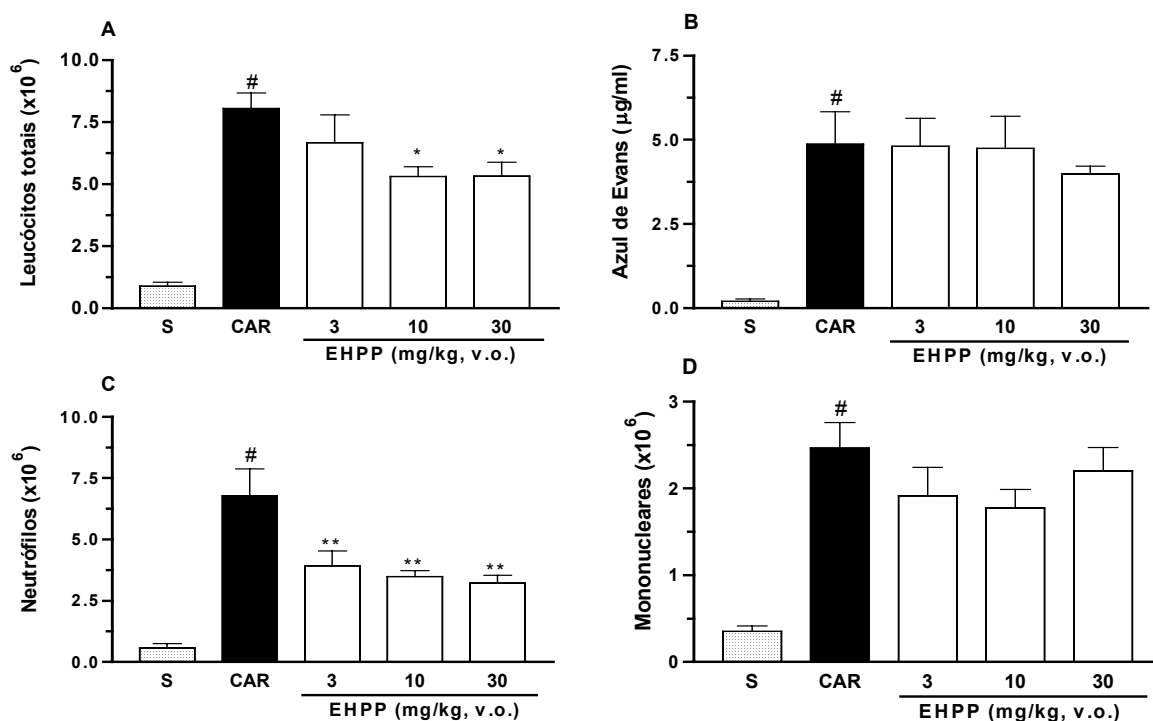
A Figura 17 demonstra que o EHPP (30 e 300 mg/kg, v.o., 1 hora antes) foi capaz de reduzir o edema de pata causado pela administração intraplantar de carragenina (300  $\mu$ g/sítio), na segunda hora após a injeção do agente flogístico, somente nas doses de 30 e 300 mg/kg com inibição de  $43 \pm 2 \%$  e  $58 \pm 13 \%$ , respectivamente. Além disso, foi possível confirmar que a indometacina, um antiinflamatório não esteroide, inibidor inespecífico da cicloxigenase, reduziu quase que totalmente o edema induzido pela carragenina.



**Figura 17:** Efeito do EHPP sobre o edema de pata causado pela administração intraplantar de carragenina, em ratos. Os animais foram tratados, com indometacina ou EHPP nas doses indicadas ou veículo e após 30 min e 1h respectivamente, receberam a administração intraplantar de carragenina. O efeito antiedematogênico destas drogas, foi analisado através da variação do volume da pata medido no pletismômetro, 1, 2, 3 e 4 hs após a administração da carragenina. Os pontos representam a média de 8 animais e as barras verticais o E.P.M.. Na análise estatística  $P > 0,05$ , foi considerado não significante e  $*P < 0,05$  significante, quando comparado ao grupo controle carragenina.

### 5.9.2 Efeito do EHPP na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos

Os resultados apresentados na Figura 18 (A - D) demonstram que o tratamento dos animais com EHPP (3, 10, 30 mg/kg, v.o.) foi capaz de inibir a primeira fase do processo inflamatório (4 h) da cavidade pleural induzido pela injeção de carragenina (1%). Podemos observar que o EHPP causou uma redução da migração celular (número de leucócitos totais) para a cavidade pleural (Figura 18 A) com inibição de  $34 \pm 5\%$  para dose de 30 mg/kg, v.o.. Esta redução foi representada principalmente por uma diminuição na migração de neutrófilos (Figura 18 C) com inibição de  $53 \pm 5\%$  para dose de 30 mg/kg, v.o. e  $DI_{50}$  de 13,04 (9,28-18-32) mg/kg. Contudo, o EHPP não foi capaz de reduzir a exsudação induzida pela carragenina (Figura 18 B) e a migração de mononucleares (Figura 18 D) para o sítio inflamatório.



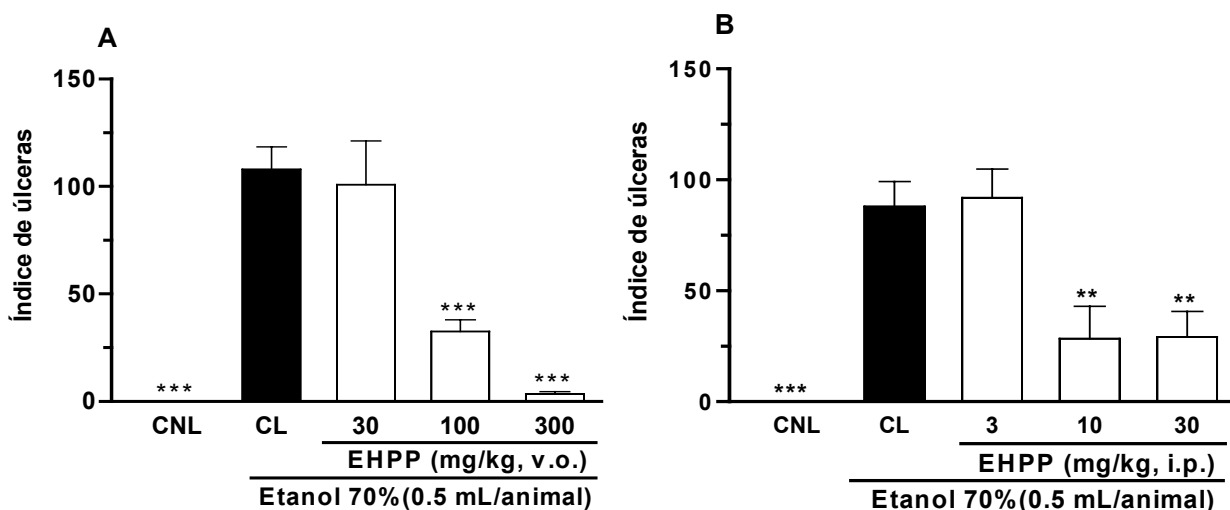
**Figura 18:** Efeito do pré-tratamento com EHPP na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Os leucócitos totais (A); extravasamento de azul de evans (B); neutrófilos (C) e mononucleares (D) foram medidos 4 h após a administração intrapleurial de carragenina na presença e na ausência das drogas. Cada coluna representa a média de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M.. Na análise estatística  $P > 0,05$ , foi considerado não significativo,  $*P < 0,05$  significativo quando comparado ao grupo controle tratado com carragenina (CAR) e  $\#P < 0,001$  significativo quando comparado ao grupo controle tratado com salina (S).

## 5.10 Atividade protetora gástrica do EHPP

### 5.10.1 Efeito do EHPP sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% em ratas

A Figura 19 (A e B) mostra a atividade protetora gástrica do EHPP, administrado por via oral, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, e nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, por via intraperitoneal. Quando administrado por via oral, o EHPP, foi capaz de reduzir o índice de úlceras apresentando  $DI_{50}$  de 101,6 (78,8-130,8) mg/kg e inibição de  $97 \pm 1\%$  na dose de 300 mg/kg. Quando administrado por via intraperitoneal, o EHPP reduziu o índice de úlceras induzidas pelo etanol apresentando  $DI_{50}$  de 13,03 (7,8 - 21,81) mg/kg e inibição de  $74 \pm 3\%$ , na dose de 10 mg/kg.

O extrato administrado na dose de 30 mg/kg, v.o. e de 3 mg/kg, i.p. não protegeu a mucosa.

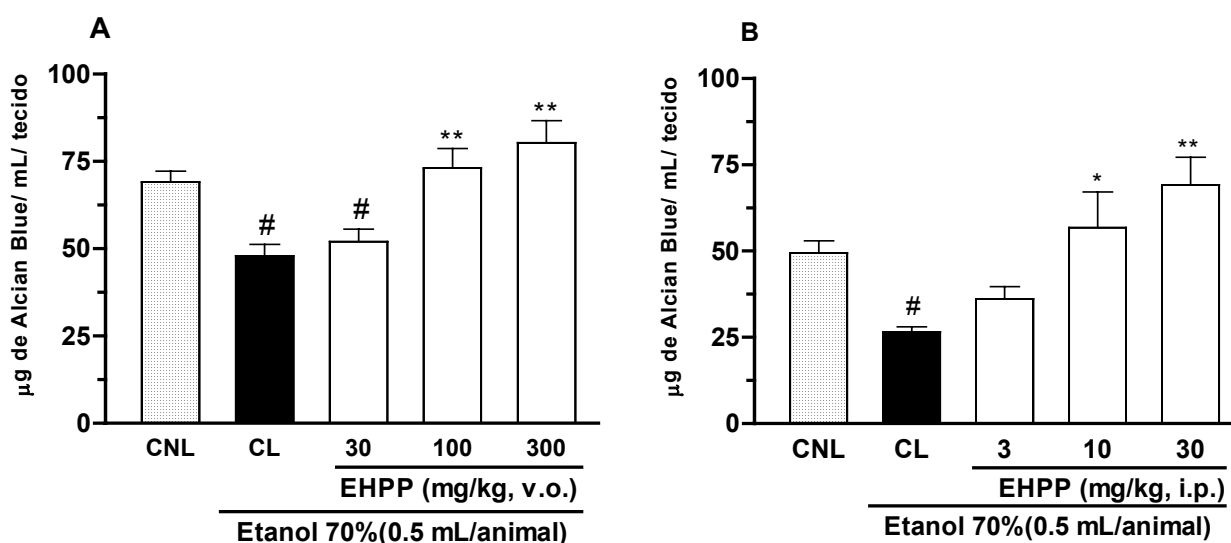


**Figura 19:** Efeito do EHPP, sobre as lesões gástricas induzidas por etanol 70% (A e B), em ratas. Os animais foram tratados com o extrato ou veículo, 1h antes por via oral (A) ou 30 minutos antes pela via intraperitoneal (B), nas doses indicadas e após ocorreu a administração do etanol 70%. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E.P.M. A barra hachurada corresponde ao grupo controle não lesado (CNL) tratado somente com água, a barra fechada, ao grupo controle lesado (CL) tratado com o etanol (0,5 mL/animal, v.o.) e as barras abertas correspondem aos grupos tratados com

etanol e extrato. Na análise estatística, foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e  $***P < 0,001$ , significativo quando comparado ao grupo controle (C).

### 5.10.2 Efeito de EHPP sobre a quantidade de muco da mucosa gástrica após a indução de lesões com etanol 70%, em ratas

A Figura 20 (A e B) mostra o efeito do EHPP, administrado pela via oral ou por via intraperitoneal, na proteção da mucosa gástrica contra o estímulo lesivo do etanol. O EHPP, administrado por via oral, foi capaz de promover um aumento da secreção de muco gástrico (doses de 100 e 300 mg/kg, v.o. e 10 e 30 mg/kg, i.p.), quando comparado ao grupo controle lesado (CL), que foi somente tratado com etanol. Nestas mesmas doses, a quantidade de muco gástrico foi restabelecida ao nível da mucosa não lesada (CNL).

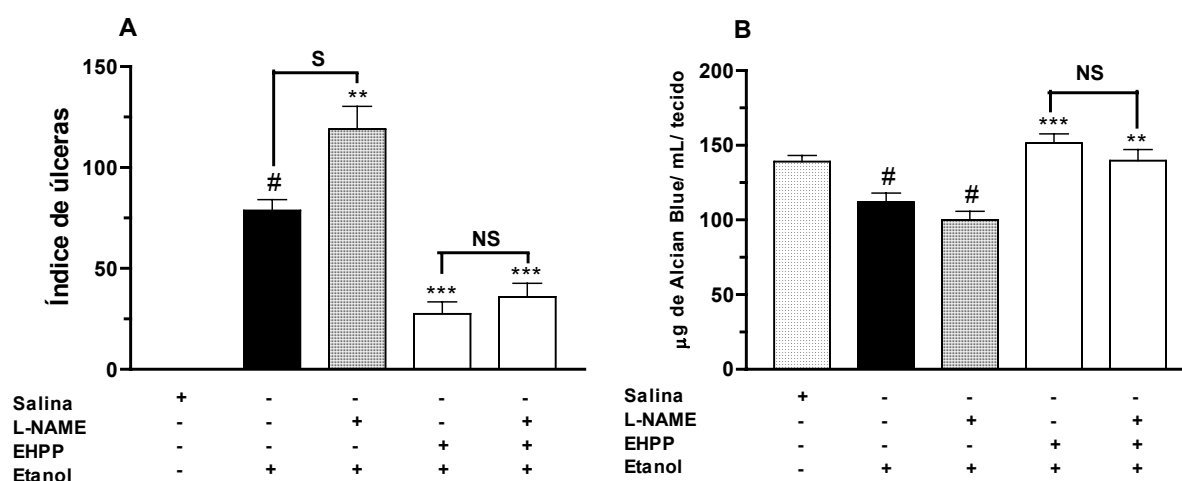


**Figura 20:** Efeito do tratamento dos animais com EHPP sobre as concentrações de muco da mucosa glandular gástrica de ratas (A e B). Os animais foram tratados com o extrato (barras abertas) ou veículo (CNL, barra hachurada), 1h e 30 min. antes por via oral (A) ou via intraperitoneal (B), nas doses indicadas e após este período estes animais e o grupo controle lesado (CL, barra fechada) receberam por via oral etanol 70%. Cada grupo representa a média da concentração da Alcian Blue e as barras verticais o E.P.M.. Na análise estatística,  $P > 0,05$  foi considerado não significativo,  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$  significativo quando comparado ao grupo controle lesado (CL) e  $\#P < 0,01$  significativo quando comparado ao grupo controle não lesado (CNL).



### 5.10.3 Influência da inibição do óxido nítrico sintase sobre a atividade protetora gástrica do EHPP, após a indução de lesões com etanol 70%, em ratas

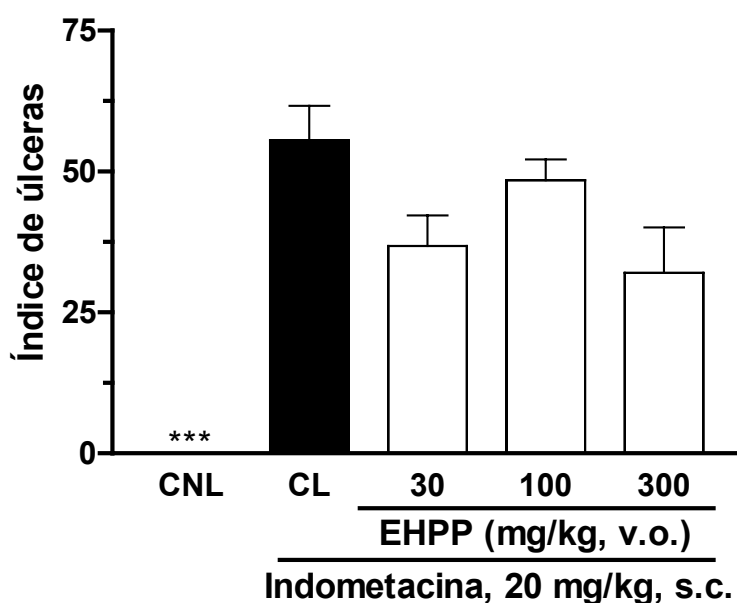
Os resultados apresentados na Figura 21 (A e B) demonstram que o tratamento dos animais com um inibidor da óxido nítrico sintase, L-NAME (70mg/kg, i.p.), foi capaz de aumentar o índice de úlceras induzidas pelo etanol 70%. No entanto, não foi capaz de reverter a proteção gástrica (Inibição de  $65 \pm 7\%$ ) e a produção de muco, induzida pelo EHPP (100 mg/kg, v.o.).



**Figura 21:** Efeito do pré-tratamento com L-NAME (70 mg/kg, i.p.) e do etanol 70% sobre a atividade protetora gástrica do EHPP (100 mg/kg, v.o.), em ratas. Os animais foram pré-tratados com L-NAME e/ou etanol, sendo após 1 h, avaliado o índice de úlceras (A) e a secreção de muco gástrico (B). Cada grupo representa a média de 6 – 12 animais e as barras verticais o E.P.M.. Na análise estatística foi considerado não significativo  $P > 0,05$ ; significativo  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$ , quando comparado ao grupo tratado com etanol e  $\#P < 0,001$ , significativo quando comparado ao grupo controle salina.

#### 5.10.4 Efeito do EHPP sobre as lesões gástricas agudas induzidas por indometacina, em ratas

A Figura 22 mostra que o tratamento com o EHPP pela via oral, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, não foi capaz de reduzir significativamente o índice de úlceras da mucosa gástrica, provocado pela administração subcutânea de indometacina (20 mg/kg), quando comparado ao grupo controle lesado.

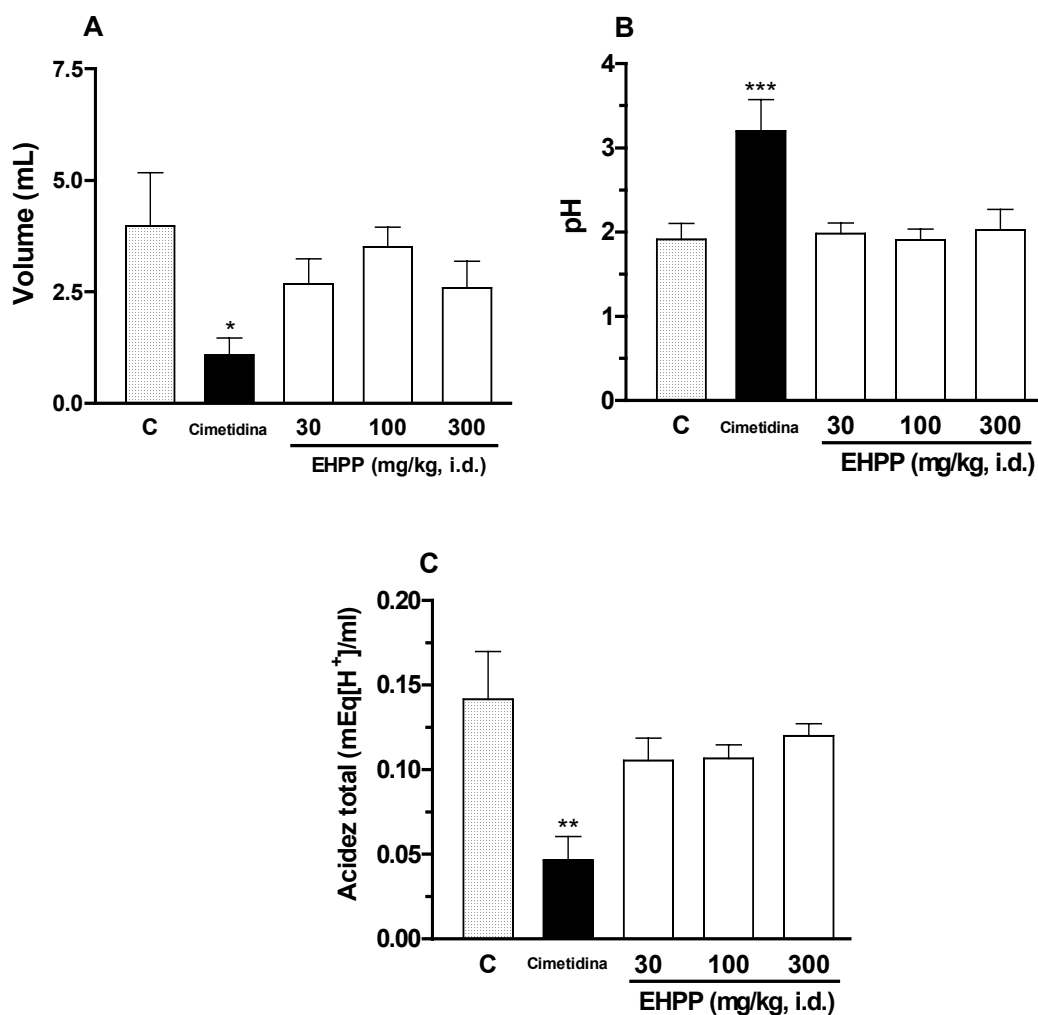


**Figura 22:** Efeito do EHPP, sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina, em ratas. Os animais foram tratados com o extrato ou veículo, 1h antes por via oral, nas doses indicadas e após ocorreu a administração da indometacina. A barra fechada corresponde ao grupo tratado com indometacina (CL) e as barras abertas correspondem aos grupos tratados com indometacina e extrato. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M.. Na análise estatística, foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e  $***P < 0,01$  significativo quando comparado ao grupo controle lesado (CL).

### **5.10.5 Avaliação da atividade anti-secretora gástrica o EHPP**

#### **5.10.5.1 Efeito do EHPP sobre a secreção ácida gástrica basal (não estimulada), quando avaliado no modelo da ligadura pilórica, em ratas**

O EHPP, quando administrado por via intraduodenal (i.d.), nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, no momento da cirurgia da ligadura pilórica, não foi capaz de alterar o volume, o pH e a acidez total do conteúdo gástrico secretado após 4 horas da cirurgia, quando comparados ao controle veículo (água 0,1 mL/100g, v.o), como apresentado na Figura 23 (A-C). Contudo a cimetidina, um antagonista de receptores  $H_2$ , foi capaz de aumentar o pH e reduzir a acidez e o volume da secreção ácida gástrica.

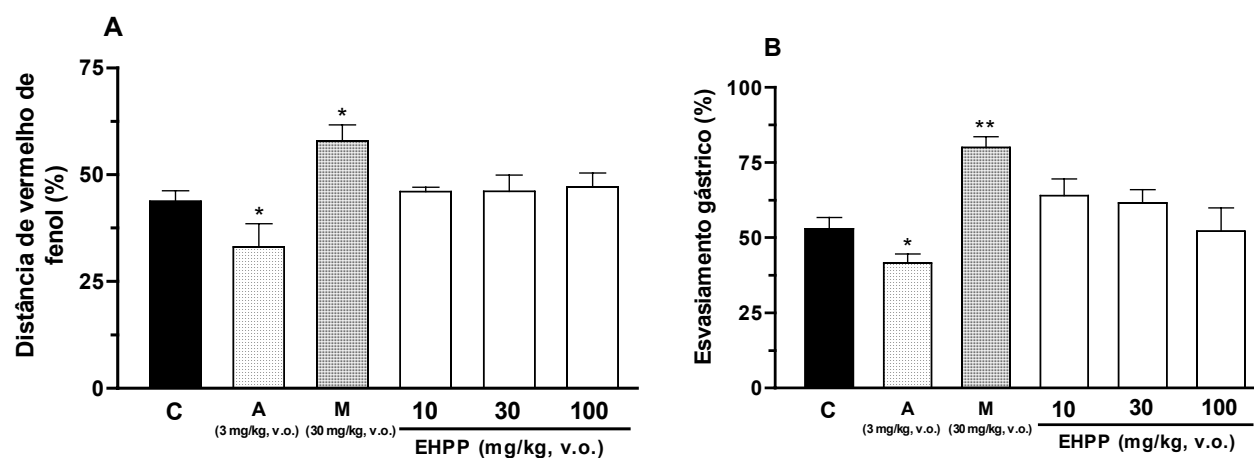


**Figura 23:** Efeito do EHPP sobre a secreção ácida gástrica basal, em ratas. Os animais foram tratados com o extrato no momento da cirurgia por via intraduodenal, nas doses indicadas. A barra fechada corresponde ao grupo tratado com cimetidina, a barra hachurada, ao grupo controle (C) tratado com água e as barras abertas correspondem aos grupos operados e tratados com o extrato. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M.. Na análise estatística, foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$ , \* $P < 0,05$  significativo quando comparado ao grupo controle (C).

## 5.11 Avaliação da atividade do EHPP sobre as atividades gerais do trato gastrointestinal

### 5.11.1 Atividade do EHPP sobre o trânsito intestinal e esvaziamento gástrico

A Figura 24 mostra que o tratamento com o EHPP, pela via oral, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, não modificou o trânsito intestinal e o esvaziamento gástrico, quando comparado aos grupos controle (C: água 0,1 mL/100g, v.o.), bem como, quando comparado à atropina (A: 3 mg/kg, v.o., um antagonista muscarínico), redutor da motilidade intestinal, ou metoclopramida (M: 30 mg/kg, v.o., agente pró-cinético), estimulador da motilidade intestinal.



**Figura 24:** Efeito do EHPP, sobre o trânsito intestinal (A) e esvaziamento gástrico (B), em camundongos. Os animais foram tratados com o extrato, atropina e metoclopramida 1h antes, nas doses indicadas. A barra fechada corresponde ao grupo controle (C) tratado com veículo e as barras hachuradas, aos grupos controle tratados com A (atropina) e M (metoclopramida); as barras abertas correspondem aos grupos tratados com o extrato. Cada grupo representa a média de 8 animais e as barras verticais os E.P.M.. Na análise estatística, foi considerado não significativo  $P > 0,05$  e  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$  significativo quando comparado ao grupo controle (C).

## 6 DISCUSSÃO

Embora a fitoterapia já agregue um contingente apreciável de trabalhos realizados e publicados, constitui, ainda, um vasto campo para pesquisa.

Nos últimos dez anos, o número de publicações científicas, nos países latino-americanos, aumentou muito (CALIXTO, 2005). O interesse pela fitomedicina cresceu e está crescendo, devido à busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças cujos cuidados baseiam-se no uso de medicamentos que apresentam uma série de efeitos colaterais e muitas vezes aliviam parcialmente os sintomas sem tratar a doença (ALICE *et al.*, 1995).

Dessa forma, o potencial natural encontrado nos países latino-americanos, principalmente no Brasil, aliado à diversidade de compostos bioativos encontrados, especialmente nas plantas superiores, têm atraído a atenção da comunidade científica e das indústrias farmacêuticas que apostam na produção de fitoterápicos como um negócio lucrativo, uma vez que a utilização de plantas medicinais atinge um público cada vez maior (CALIXTO, 2005).

O aumento do emprego dos produtos naturais traz consigo o uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e toxicológico, o que é fato preocupante e também chama a atenção dos pesquisadores, uma vez que isto está acontecendo com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população, em todo país (ALICE *et al.*, 1995).

Entre as várias espécies utilizadas pela população estão as plantas do gênero *Polygala* que são amplamente distribuídas no litoral brasileiro, sendo encontradas principalmente em zonas costeiras de solos arenosos, da Bahia ao Rio Grande do Sul. Inúmeros representantes do gênero *Polygala* contêm altas concentrações de salicilato de metila, que confere odor característico em suas raízes (WASICKY, 1945). Nos estados acima da Bahia, são conhecidas popularmente pelo nome de erva-iodex e seu extrato alcoólico é usado, na forma de aplicações locais, em entorces, machucados ou artropatias crônicas (LORENZI e MATOS, 2002).

Nas regiões costeiras do sul e sudeste, principalmente no estado de Santa Catarina, são encontradas diversas espécies de plantas que pertencem ao gênero *Polygala*, incluindo *P. cyparissias* St. Hillaire & Moquin, *P. linoides* var. *ambigua* Felipp & Beauverd, *P. campestris* G., *P. aspalata* L., *P. sabulosa* A. W. Bennett e *P. paniculata* L. (MEOTTI *et al.*, 2006).

Entre estas espécies, a *P. paniculata*, vem sendo utilizada por longa data pela população e é conhecida popularmente como barba-de-são-joão, barba-de-são-pedro, bromil, arrozinho, alecrim-de-santa-catarina, vassourinha branca. Análises fitoquímicas têm revelado em sua composição a presença de várias cumarinas, flavonóides e xantonas (CRISTIANO, 2003), além de um óleo essencial que é utilizado para o tratamento da asma, bronquite crônica e doenças relacionadas. Esta planta também é usada para dor de estômago, diarreia, nefropatias e em acidentes ofídicos (LORENZI e MATOS, 2002). Apesar do seu grande uso, a eficácia e a segurança de suas preparações não foram, comprovadas cientificamente.

A *P. paniculata* vem sendo recentemente pesquisada. Estudos anteriores realizados por Pizzolatti e colaboradores (2003) demonstraram que as frações diclorometano e hexanólica do extrato bruto da *P. paniculata* apresentaram atividade tripanossomicida contra a forma epimastigota do parasita *Trypanosoma cruzi*. Outro trabalho, conduzido por Farina e colaboradores (2005) constatou importante atividade neuroprotetora e antioxidante do extrato bruto hidroalcoólico da *P. paniculata*, em relação a neurotoxicidade induzida pelo metilmercúrio.

Estes trabalhos mostram claramente o potencial farmacológico da *P. paniculata*. Adicionalmente, o presente estudo, baseando-se nas indicações populares, mostrou pela primeira vez, quando administrado sistemicamente, que o EHPP apresentou significativa atividade antinociceptiva em diferentes modelos de nocicepção química, em camundongos. Além disso, foi demonstrado que o extrato apresentou atividade antiinflamatória parcial e importante atividade protetora gástrica, em modelos de indução aguda de lesões gástricas.

Os dados mais relevantes deste trabalho foram: (1) o EHPP, quando administrado pela via oral, reduziu de maneira dependente da dose o número de

contorções abdominais induzida pelo ácido acético e a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, capsaicina e glutamato, sendo que, nesse último modelo, o efeito permaneceu significativo até a oitava hora; (2) a ação antinociceptiva do EHPP, não foi revertida pelo pré-tratamento dos animais com L-arginina e naloxona; (3) os compostos isolados, principalmente a rutina, apresentaram atividade antinociceptiva no modelo de nocicepção química induzido pela injeção intraplantar de glutamato; (4) quando administrados sistemicamente o EHPP e a rutina (i.p.) reduziram de maneira significativa a nocicepção induzida pela injeção intratecal de AAE (glutamato, NMDA) e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ); (5) o EHPP apresentou efeito antiinflamatório parcial nos modelos do edema de pata em ratos e de pleurisia em camundongos; (6) o EHPP também apresentou atividade protetora gástrica, reduzindo o índice de úlceras na mucosa causado pela administração oral de etanol 70%. Neste modelo, o EHPP foi administrado pelas vias oral e intraperitoneal, sendo que esta proteção está relacionada ao aumento da produção de muco gástrico.

Atualmente, o interesse para o uso clínico de novas substâncias com atividade analgésicas, utilizadas principalmente para o tratamento de vários tipos de dor (tanto de origem neurogênia quanto inflamatória), vem aumentando significativamente. Vários modelos de nocicepção em animais de laboratório foram desenvolvidos para verificar a atividade analgésica de extratos e compostos.

Entre os modelos de nocicepção utilizados neste trabalho, o teste das contorções abdominais, induzidas pelo ácido acético, é descrito como um típico modelo para avaliar a dor de origem inflamatória, pouco específico, mas com boa sensibilidade, sendo uma ferramenta de triagem para avaliação da atividade analgésica e antiinflamatória de novos agentes (IKEDA *et al.*, 2001; LE BARS *et al.*, 2001).

Neste modelo, a administração de um agente irritante para membrana serosa, como o ácido acético, provoca comportamentos estereotipados em camundongos e ratos, que são caracterizados por contorções abdominais, redução e incoordenação



da atividade motora. Estes comportamentos são considerados reflexos e evidenciam a dor visceral (LE BARS *et al.*, 2001).

Através da realização deste teste, foi possível observar que a administração sistêmica, v.o. do EHPP reverteu, de maneira dependente da dose, o número de contorções abdominais produzidas pela injeção i.p. de ácido acético em camundongos. A irritação local, provocada pela administração deste agente na cavidade intraperitoneal desencadeia a liberação de vários mediadores como a bradicinina, substância P e prostaglandinas, principalmente a PGI<sub>2</sub>, bem como algumas citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-8 (CORREA *et al.*, 1996; RIBEIRO *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001). Estes mediadores ativam nociceptores quimiossensíveis que contribuem com o desenvolvimento da dor de origem inflamatória. Dessa forma, o resultado obtido neste trabalho sugere que o efeito antinociceptivo do EHPP pode estar relacionado à inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios, induzida pelo ácido acético.

Os resultados obtidos no presente estudo também demonstraram que o EHPP não apresentou qualquer interferência sobre a atividade locomotora, causando incoordenação motora ou ainda efeitos relaxantes sobre a musculatura, assegurando que o efeito antinociceptivo observado não está relacionado a um destes efeitos inespecíficos.

Outro modelo empregado neste trabalho foi o de nocicepção induzida pela formalina. Este modelo consiste na injeção intraplantar ou subcutânea desta substância. A resposta provocada pela formalina constitui-se duas fases de nocicepção: uma fase inicial e uma tardia, que parecem envolver mediadores químicos diferentes (TJOLSEN e HOLE, 1997; SANTOS *et al.*, 1999; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004).

A fase inicial é caracterizada pela dor de origem neurogênica causada pela estimulação química direta dos nociceptores das fibras sensoriais aferentes, principalmente fibras do tipo C. A fase tardia é representada pela dor de origem inflamatória que é desencadeada por uma combinação de estímulos que incluem inflamação nos tecidos periféricos e mecanismos de sensibilização espinhal e central

(TJØSEN *et al.*, 1992; TJØLSEN e HOLE, 1997). Vários trabalhos têm demonstrado que a administração intraplantar de formalina em roedores produz significativo aumento dos níveis espinais de diferentes mediadores como aminoácidos excitatórios, neuropeptídeos, PGE<sub>2</sub>, óxido nítrico e cininas (MALMBERG e YARSH, 1995; SANTOS e CALIXTO, 1997; SANTOS *et al.*, 1998; OMOTE *et al.*, 1998).

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível mostrar que o EHPP foi capaz de reduzir de forma significativa tanto a fase inicial, quanto a fase tardia da resposta à formalina, onde o extrato apresentou seu efeito mais pronunciado. Estes dados reforçam os indícios de que a planta em questão possui um importante efeito antinociceptivo e antiinflamatório, pois é nesta fase que ocorre a liberação de mediadores pró-inflamatórios, ocorrendo a ativação de neurônios aferentes sensibilizados, devido à liberação anterior de mediadores neuroativos (TJOLSEN e HOLE, 1997; SANTOS e CALIXTO, 1997; SANTOS *et al.*, 1999; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004).

Apesar de ser mais efetivo na fase tardia da nocicepção evocada pela injeção de formalina, onde ocorre a inflamação dos tecido periféricos e sensibilização central, o EHPP não foi capaz de reduzir, o edema de pata causado pela administração intraplantar de formalina (dado não apresentado). Este resultado nos sugere que o extrato não interfere na liberação periférica de mediadores pró-inflamatórios como a histamina, bradicinina, leucotrienos, substância P e PAF, que contribuem com a formação do edema, mas sim, seu efeito pode estar relacionado a uma ação inibitória sobre a condução nociceptiva espinal ou central.

O efeito EHPP também foi avaliado no modelo de nocicepção neurogênica, induzida pela administração intraplantar de capsaicina em camundongos. Os dados apresentados neste trabalho indicam que o EHPP, administrado por v.o., foi capaz de reduzir a nocicepção causada pela capsaicina de maneira significativa sendo, no entanto menos efetivo, se comparado aos outros modelos de nocicepção, visto que o extrato foi efetivo em reduzir a nocicepção somente na dose de 1,0 mg/kg.

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) é o componente ativo encontrado em pimentas vermelhas, sendo uma valiosa ferramenta farmacológica para o estudo de drogas que atuam modulando a transmissão nociceptiva em mamíferos através dos neurônios sensoriais primários do tipo C e A $\delta$  (HOLZER, 1991; JANCSO, 1992).

Sua ação irritante e neurotóxica promove, quando administrada por via intraplantar, reação dolorosa caracterizada por mordidas e lambidas na pata (JULIUS e BASBAUM, 2001; LE BARS *et al.*, 2001). Estudos demonstraram que o estímulo nociceptivo causado pela capsaicina é mediado pela ativação do receptor vaniloíde (TRPV1), um canal iônico não seletivo encontrado nas fibras sensoriais de pequeno diâmetro presentes nas raízes do corno dorsal e no gânglio trigêmeo (CATERINA *et al.*, 1997). Estudos indicam que quando administrada, a capsaicina promove liberação periférica de vários mediadores, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e taquicinas que contribuem com a transmissão da informação nociceptiva (SAKURADA *et al.*, 1992; SAKURADA *et al.*, 1996).

Está bem estabelecido que os aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato, é o neurotransmissor encontrado na maioria das sinapses excitatórias rápidas no sistema nervoso de mamíferos e está envolvido em processos fisiológicos (memória e aprendizado) e em algumas patologias (neurodegeneração crônica e aguda) (GAVIRAGI, 2000). Além disso, está bem descrito na literatura que o glutamato exerce um papel crítico no processo de transmissão da dor até estruturas supraespinhais, sendo liberado na medula espinhal, após lesão tecidual ou em processos inflamatórios (ZHOU *et al.*, 1996; DICKENSON, 1997; CARLTON, 2001; BEIRITH *et al.*, 2003).

Os receptores glutamatérgicos são categorizados em dois grupos distintos: os ionotrópicos e os metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são classificados em três subtipos de acordo com sua permeabilidade a íons e o tipo de ligante, sendo denominados N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) e cainato. Os metabotrópicos são divididos em oito subtipos, todos acoplados à proteína G (GAVIRAGHI, 2000). De maneira geral, a

ativação de todos os tipos de receptores sensíveis ao glutamato participam na indução, modulação ou manutenção da dor (BEIRITH *et al.*, 2003).

Em concordância com essas afirmações, dados da literatura demonstram que substâncias capazes de bloquear os receptores glutamatérgicos tanto ionotrópicos quanto metabotrópicos, apresentam importante efeito antinociceptivo em diferentes espécies de mamíferos, inclusive em humanos (LUTFY *et al.*, 1997; NEUGEBAUER, 2002; WIECH *et al.*, 2004).

Em um estudo, Beirith e colaboradores, em 2002 e 2003, demonstraram que o glutamato quando administrado por via intraplantar em roedores, desencadeia um comportamento nociceptivo rápido e de curta duração, associado à formação de edema de pata, que é desencadeado de maneira dependente da dose administrada de glutamato. A resposta nociceptiva estava fortemente relacionada à ativação de receptores NMDA e não-NMDA (AMPA, cainato e metabotrópico). O edema pareceu ser mediado principalmente por receptores glutamatérgicos do tipo não-NMDA, pelo NO e taquicininas.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o EHPP, administrado por v.o., apresentou importante atividade antinociceptiva no modelo do glutamato, apesar disso, não foi capaz de reduzir o edema de pata provocado pela administração deste agente (resultado não apresentado).

Foi observado ainda que o EHPP, administrado por v.o., quando avaliado no teste do glutamato, produziu um significativo efeito antinociceptivo que se manteve por 8 horas e foi mais pronunciado da primeira a quarta hora. Estes dados foram utilizados como referencial para os demais tratamentos.

Nossos dados também demonstraram que o efeito antinociceptivo do extrato pode ser explicado, em parte, por uma possível interação de um ou mais componentes do extrato com receptores glutamatérgicos em nível periférico ou central, porém esta interação não estaria interferindo com a liberação dos mediadores envolvidos na formação do edema como as taquicininas e NO.

Com o objetivo de avaliar mais detalhadamente o efeito do EHPP, no modelo do glutamato, alguns compostos isolados da *P. paniculata* foram também avaliados, neste mesmo modelo.

De acordo com análises fitoquímicas, vários compostos com atividade biológica, como xantonas, cumarinas, flavonóides e esteróis estão presentes na planta em estudo.

Estudos anteriores, realizados com outras espécies do gênero, demonstraram que a cumarina isolada da *Polygala. sabulosa* A. W. Bennett apresentou uma importante atividade antinociceptiva no modelo de nocicepção química induzida pelo ácido acético (MEOTTI *et al.*, 2006). Um outro trabalho indicou que as xantonas isoladas da *Polygala. cyparissias* St. Hillaire & Moquin além de demonstrarem importante atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção química e mecânica, apresentaram importante atividade antiespasmódica em um modelo *in vitro*, utilizando traquéia de cobaia sensibilizada por ovalbumina (CAMPOS *et al.*, 1997; El SAYAH *et al.*, 1999).

Dos compostos já identificados e isolados apartir da *P. paniculata*, duas cumarinas; febalosina e o aurapten, bem como, um flavonóide; a rutina, são encontrados em maior quantidade.

Avaliando a atividade antinociceptiva dos compostos isolados, foram obtidos importantes resultados. Tanto a febalosina, como o aurapten foram administrados sistemicamente por via i.p.e reduziram de forma significativa a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato, porém somente em uma dose (10 e 100 mg/kg, respectivamente). Em contrapartida, a rutina, administrada i.p., foi capaz de reverter a nocicepção induzida pelo glutamato significativamente e de forma dose-dependente, caracterizando-se por ser o composto que apresentou a melhor atividade.

Os resultados do presente trabalho demonstraram também que tanto o EHPP como a rutina reduziram, de maneira significativa, a nocicepção causada tanto pela administração i.t. de glutamato (agonista glutamatérgicos) quanto pela administração

i.t. de NMDA (agonista dos receptores ionotrópicos tipo NMDA), sem interferir na nocicepção promovida pelo trans-ACPD.

A administração intratecal de AAE desencadeia comportamentos nociceptivos espontâneos como elevação da cauda, mordidas, lambidas dos membros posteriores (contato do focinho do animal com o membro) e elevação de uma das patas traseiras (OSBORNE e CODERRE, 2003).

Os resultados obtidos neste teste sugerem que o efeito antinociceptivo obtido no modelo da administração intraplantar e intratecal do glutamato seja em parte devido à interação de um ou mais compostos, presentes no EHPP, além da rutina, com receptores glutamatérgicos ionotrópicos sensíveis ao NMDA.

Estes dados também sugerem que este mecanismo pode ainda estar envolvido indiretamente no efeito antinociceptivo do EHPP em outros modelos de nocicepção realizados neste trabalho, como o da formalina e capsaicina, visto que estudos evidenciam que aminoácidos excitatórios são liberados na medula espinhal ou na pata em resposta a injeção intraplantar de formalina, capsaicina ou substância P, ou ainda em processos inflamatórios (BEIRITH *et al.*, 2002).

Este trabalho também demonstrou que o EHPP administrado por v.o. e a rutina administrado por via i.p. reduziram a nocicepção causada pela injeção intratecal das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . A administração intratecal de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  desencadeia movimentos nociceptivos espontâneos como os provocados pela administração intratecal de AAE.

Citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  participam ativamente de processos inflamatórios e da transmissão nociceptiva (IKEDA *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 2001; VANEGAS e SCHAIBLE, 2001).

A citocina inflamatória IL-1 $\beta$  é produzida e secretada sobre condições patológicas associadas a neuropatias, crescimento tumoral e doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide (SOMMER e KRESS, 2004).

O TNF- $\alpha$  é considerado uma citocina inflamatória primária, devido seu papel de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8), sendo que o ponto final da cascata resulta na ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2) (SOMMER e

KRESS, 2004). A IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  são produzidas e liberadas durante a inflamação periférica e também, nas mesmas condições, são liberados por células presentes no SNC, como células de Schwann, mononucleares (SOMMER e KRESS, 2004; KLEINSCHNITZ *et al.*, 2004) e pela glia (VITKOVIC *et al.*, 2000; WIESELER-FRANK *et al.*, 2004).

Além disso, um recente trabalho, realizado por Kleinschnitz e colaboradores (2004), demonstrou que os receptores glutamatérgicos NMDA modulam a expressão de citocinas inflamatórias, como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  em modelos de lesão de nervo periférico, em camundongos. Este resultado nos fornece subsídios, indicando que o extrato e o composto isolado, possam estar interferindo direta ou indiretamente com a ação de citocinas, ou ainda estar inibindo a resposta nociceptiva desencadeada pela IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , atuando em receptores glutamatérgicos ionotrópicos tipo NMDA.

Os dados apresentados neste trabalho ainda indicam grandes diferenças em relação à atividade antinociceptiva apresentada pela rotina e pelo EHPP. O extrato foi cerca de 300 vezes mais potente em inibir a nocicepção causada pela administração intratecal de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , respectivamente.

Outro dado de igual importância nos mostra que o EHPP ainda foi cerca de 30 vezes mais potente e cerca 2,2 vezes mais eficaz (em termos de inibição máxima) em reduzir a nocicepção causada pela administração intratecal de glutamato e NMDA, em comparação à rotina.

Estes resultados, por tanto, indicam que apesar da rotina ser o composto em maior quantidade no EHPP, o efeito antinociceptivo, demonstrado pelo extrato, deva estar relacionado à presença de outros compostos encontrados em menor quantidade, porém mais potentes. A atividade do extrato pode ainda ser atribuída a ação sinérgica de vários compostos, estando entre eles a rotina, visto que estudos fitoquímicos realizados com o EHPP apontam a presença de cinco compostos desconhecidos, além daqueles já identificados e isolados (dados não publicados).

Nossos dados também demonstram que a via da L-arginina-óxido nítrico não está envolvida no efeito antinociceptivo do EHPP, uma vez que a L-arginina não foi

capaz de reverter o efeito antinociceptivo do extrato, quando administrado sistemicamente.

Está bem descrito que a via da L-arginina – óxido nítrico, também exerce um papel importante na modulação na nocicepção, uma vez que a ativação de receptores glutamatérgicos, especialmente o NMDA, pode estimular a atividade de enzimas intracelulares como a óxido nítrico sintase (NOS) através do aumento de cálcio intracelular e a produção de uma variedade de segundos mensageiros, como o óxido nítrico (NO), relacionados com a transmissão e perpetuação da condução dolorosa (BEIRITH *et al.*, 2002).

Em nossos experimentos ainda foi possível constatar como descrito na literatura que a L-N<sup>ω</sup>-nitro-arginina (L-NOARG - inibidor da óxido nítrico sintase), quando administrado por via intraperitoneal, reduziu marcadamente a nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato. Este efeito da L-NOARG foi totalmente revertido, com a injeção sistêmica por via i.p., da L-arginina, substrato da NOS.

Outro mecanismo de ação investigado foi o envolvimento do sistema opióide na atividade antinociceptiva do EHPP.

Os efeitos centrais dos opióides na transmissão da dor, por interação com seus receptores ( $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ ), no corno dorsal da medula espinhal e regiões supraespinhais, têm sido reconhecidos por algum tempo. Em adição, os receptores opióides estão presentes também nos terminais periféricos das fibras aferentes sensoriais (SAWYNOK, 2003).

Inúmeros estudos comportamentais têm sido utilizados para examinar os efeitos antinociceptivos dos opióides exógenos, como a morfina e também de extratos obtidos a partir de plantas medicinais.

Dentro deste contexto, este trabalho também demonstrou que quando administrada por via subcutânea, a morfina foi capaz de reverter totalmente a nocicepção causada pela administração intraplantar de glutamato. Este efeito se deve a sua ligação a receptores opióides localizados em vários níveis de transmissão.



Durante nossos experimentos, também foi observado que a naloxona, um antagonista não específico de receptores opióides, reduziu significativamente a nocicepção causada pela morfina, contudo, não reverteu a nocicepção promovida pelo EHPP.

Estes resultados sugerem que a atividade antinociceptiva do EHPP parece não estar envolvida com o sistema opióide. Esta hipótese pode ser reforçada pelo fato do extrato apresentar pouca atividade, na primeira fase (dor neurogênica) da nocicepção induzida pela formalina e por não interferir com a latência ao estímulo térmico nocivo, no modelo do *tail flick*.

O modelo da elevação da cauda (*tail flick*) consiste na aplicação térmica de uma fonte radiante de calor, como estímulo nociceptivo na cauda do animal provocando um rápido movimento de retirada da cauda (D'AMOUR e SMITH, 1941; SMITH *et al.*, 1943). Este movimento pode ser caracterizado como um reflexo organizado que usualmente envolve neurônios motores que inervam os três grupos musculares que controlam os movimentos da cauda (DOUGLASS e CARSTENS, 1997). Este estímulo também desencadeia a ativação de interneurônios nociceptivos que fazem conexões com os neurônios motores (DOUGLASS e CARSTENS, 1997). Do ponto de vista farmacológico, este método é eficiente para verificar a atividade analgésica de substâncias com características semelhantes aos opióides (Le BARS *et al.*, 2001), uma vez que a morfina, administrada sistemicamente, foi capaz de suprimir respostas de neurônios espinhais ao estímulo térmico nocivo da cauda (DOUGLASS e CARSTENS, 1997).

Os resultados obtidos neste trabalho estendem os dados descritos na literatura, mostrando claramente que o EHPP apresenta importante atividade antinociceptiva. Além disso, tendo como base o emprego popular da *P. paniculata*, usada muitas vezes em lesões como entorses, machucados e processos inflamatórios crônicos como artrite e artrose, a atividade antinflamatória do EHPP foi verificada.

Em adição, vários dados encontrados na literatura reforçam esta hipótese. Está bem descrito que as cumarinas e flavóides como a rutina, encontradas em

muitas plantas medicinais, apresentam grande atividade antioxidante e antiinflamatória (SELLOUM *et al.*, 2003; De SOUZA e De GIOVANI, 2004; KIM *et al.*, 2005; BAJPAI *et al.*, 2005; MICELI *et al.*, 2005; ALIA *et al.*, 2006).

No presente trabalho podemos constatar que o EHPP apresentou importante atividade antiinflamatória quando analisada no modelo de pleurisia induzida pela administração intrapleural de carragenina reduzindo, de forma dose dependente a migração celular de neutrófilos para a cavidade pleural. O EHPP também foi capaz de reduzir de maneira significativa o edema de pata causado pela administração intraplantar de carragenina.

Trabalhos descritos anteriormente (HENRIQUES *et al.*, 1990; HENRIQUES, 1993), demonstraram que a administração de carragenina na cavidade pleural de camundongos induz uma resposta inflamatória, bifásica, com aumento significativo tanto do número total de células quanto da exsudação. Dessa forma, foi determinado que este padrão de resposta é representado por duas fases, sendo uma precoce (primeira fase) e a outra tardia (segunda fase) da resposta inflamatória induzida pela carragenina em camundongos. Além disso, foi observado que a administração de carragenina na cavidade pleural promoveu um aumento gradual do número total de leucócitos, principalmente de neutrófilos, cujo pico foi em torno de 4 h seguido do decréscimo por volta de 5 h, retornando aos valores basais dentro de 24 h.

Paralelamente, também foi observado um aumento da exsudação, avaliada pelo extravasamento de azul de evans na cavidade pleural, com picos entre 4 e 5 h da indução da pleurisia.

Deste modo, a carragenina tem sido o agente irritante mais utilizado para o estudo do processo inflamatório na cavidade pleural, principalmente por induzir intensa reação inflamatória (DE BRITO, 1989). Alguns estudos mostram que a resposta inflamatória induzida pela carragenina é, em parte mediada pela bradicinina (SALEH *et al.*, 1997), sendo que a carragenina também promove a liberação de outros agentes como os prostanoídes, histamina e serotonina (DE BRITO, 1989), observando-se que a liberação da bradicinina pode estar ligada com um processo proteolítico produzido pela própria carragenina (DI ROSA e SORRENTINO, 1968).

Os nossos resultados mostram que o EHPP foi capaz de inibir de forma significativa e dependente da dose, porém parcial, o influxo de leucócitos (migração), principalmente de neutrófilos, para a cavidade pleural, sem interferir na exsudação.

Dessa forma, o dado do presente trabalho sugere que um ou mais componentes do extrato estejam promovendo o efeito observado, principalmente por interferir na atividade dos mediadores pró-inflamatórios principalmente ligados à migração celular.

O modelo de inflamação, induzido pela injeção intraplantar de carragenina, é considerado um importante teste para pesquisa de drogas antiinflamatórias (CRUNKHORN e MEACOCK, 1971; HENRIQUES *et al.*, 1987). A administração de carragenina na pata promove intensa vasodilação e extravasamento plasmático mediados pela liberação de substâncias como cininas, taquicinas, óxido nítrico, prostanoídes, bem como a liberação de serotonina e histamina a partir de mastócitos (CRUNKHORN e MEACOCK, 1971; ALVES *et al.*, 1999). Além de desencadear a formação do edema, estes mediadores contribuem fortemente com a migração celular, principalmente de neutrófilos para o sítio inflamatório, como demonstrado por Henriques e colaboradores (1987) através da análise histológica da região subplantar da pata, realizado 4 horas após a administração de carragenina.

Nossos resultados demonstraram que o EHPP reduziu significativamente o edema de pata induzido pela administração intraplantar de carragenina em ratos. Além disso, foi possível demonstrar que o pré-tratamento com indometacina, um conhecido antiinflamatório não esteroidal aboliu quase totalmente o edema. Este dado está de acordo com o descrito na literatura que descrevem tanto a indometacina, quanto a dexametasona (um antiinflamatório esteroidal), como drogas antiinflamatórias com importante efeito antiedematogênico no modelo do edema de pata induzido pela carragenina (HENRIQUES *et al.*, 1987).

Em adição, o efeito antiinflamatório parcial do EHPP neste modelo, pode ser atribuído à ação de um ou vários compostos presentes no extrato entre eles a rutina. Um trabalho realizado por Selloum e colaboradores (2003), indicou que a rutina, quando administrado por v.o., reduziu o edema de pata e a migração celular de

neutrófilos, a partir da segunda hora, após a administração de carragenina. Também foi demonstrado que a rutina apresenta um potente efeito inibitório sobre o burst respiratório de neutrófilos estimulado pela f-Met-Leu-Phe (SELLOUM *et al.*, 2003). Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo vão de encontro aos descritos na literatura e indicam que a atividade antiinflamatória do EHPP, observada no modelo do edema de pata e pleurisia, pode ser em parte atribuída à rutina.

Além de ser utilizada como antiinflamatória e analgésica, a *P. paniculata* também apresenta indicação popular para “problemas gástricos”. Em adição, muitas das etapas dos processos de gastrite e úlcera envolvem componentes relacionados à dor e inflamação. Desta forma, a presença da ação protetora gástrica foi investigada.

Os resultado obtidos neste estudo mostraram pela primeira vez que o EHPP administrado sistemicamente por via oral foi capaz de proteger a mucosa gástrica contra lesões induzidas pelo etanol 70%.

Está bem descrito que o etanol exerce sua ação lesiva através da agressão física da mucosa, causada pelo seu efeito direto sobre a mesma, caracterizando-se por esfoliação, erosão do epitélio, lesão vascular da mucosa e necrose celular (SZABO *et al.*, 1985).

Em adição, o EHPP quando administrado por via intraperitoneal, também apresentou importante efeito citoprotetor. Este dado é de grande importância, pois tendo ele como base, pode-se descartar a possibilidade do efeito observado quando o EHPP foi administrado por via oral, ter ocorrido devido à aderência do extrato na mucosa, formando uma barreira protetora à ação do etanol.

Uma das indicações populares da *P. paniculata* é seu uso como anti-diarreico. Esta indicação não foi confirmada, uma vez que os resultados do presente trabalho mostraram que o EHPP não alterou o trânsito e motilidade intestinal, quando comparado aos controles atropina e metoclopramida. Está bem estabelecido que tanto a metoclopramida (um importante antiemético e pró-cinético) como a atropina (um antagonista muscarínico – redutor da motilidade intestinal) apresentam

importante aplicação na medicina clínica e em modelos experimentais (SCARPIGNATO, 1990; VAN HOOOGMOED, 2003; BURGER *et al.*, 2006).

Nossos resultados também demonstraram que o efeito protetor exercido pelo EHPP, sobre as lesões agudas induzidas pelo etanol, está relacionado ao aumento da produção de muco gástrico. Este efeito foi observado quando o extrato foi administrado tanto por via oral como por via intraperitoneal, sendo que por esta via foi 10 vezes mais potente em relação ao aumento da produção de muco.

O muco é um dos principais fatores de defesa da mucosa contra agentes agressivos. Serve como uma barreira física sobre a mucosa e é continuamente secretado por células epiteliais (MÖZSIK *et al.*, 1997; BI e KAUNITZ, 2003). Sua produção pode ser estimulada por muitos mediadores, entre eles fatores do crescimento, acetilcolina, óxido nítrico e prostaglandinas (ICHIKAWA *et al.*, 2000).

O presente estudo também mostrou que o EHPP não foi capaz de proteger a mucosa contra as lesões induzidas pelo antiinflamatório não esteroide indometacina, sugerindo que neste extrato não estão presentes ou não estão em concentração suficiente, compostos que exercem interação com a síntese de prostanóides.

Também foi possível observar em nosso estudo que a indometacina, um antiinflamatório não esteroide, foi capaz de lesionar a mucosa gástrica, caracterizando-se como uma importante ferramenta experimental. Esta atividade já se encontra bem descrita na literatura, uma vez que a interferência com a atividade da COX promove a inibição da produção de prostaglandinas. Além do seu papel como importante mediador na dor e na inflamação, as prostaglandinas exercem um papel fisiológico primordial na manutenção da integridade gástrica, por estarem envolvidas com a produção do muco protetor do epitélio gástrico e bicarbonato (FIORUCCI *et al.*, 2003; SAWYNOK, 2003; WHITLLE, 2004).

Os principais fármacos capazes de proteger a mucosa gástrica, comercializados atualmente (cimetidina, ranitidina e omeprazol) apesar de atuarem por vias diferentes (receptores  $H_2$  e  $H^+-K^+-ATPase$ ), reduzem a secreção ácida gástrica. Para verificar se o efeito citoprotetor do EHPP, observado no modelo do

etanol, estava relacionado, pelo menos em parte, a um mecanismo de redução da secreção de ácido, realizou-se o modelo da cirurgia da ligadura do piloro.

O extrato testado nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg não foi capaz de alterar nem a quantidade nem a acidez da secreção ácida gástrica, durante as quatro horas em que os animais estavam com o piloro ligado. Foi possível sugerir então que não é através da diminuição da secreção gástrica que o EHPP exerce sua atividade citoprotetora.

Os resultados obtidos até o momento sugerem que o EHPP pode estar exercendo algum mecanismo de citoproteção, envolvido com a manutenção dos níveis de muco, que talvez não esteja relacionado ação das prostaglandinas.

McNaughton e colaboradores (1989) mostraram que o óxido nítrico (NO), bem como agentes liberadores de óxido nítrico, protegem significativamente a mucosa contra lesões induzidas pelo etanol, sendo que esta ação não foi alterada pelo pré-tratamento com indometacina, sugerindo mecanismos diferentes daqueles que envolvem prostaglandinas.

Atualmente, sabe-se, através de experimentos realizados por Masuda e colaboradores (1995), que a supressão da síntese do óxido nítrico promove diminuição do fluxo sangüíneo da mucosa, indicando que o NO diminui a lesão causada pelo etanol através da regulação da microcirculação da mucosa. Em adição, o efeito protetor do NO inclui aumento da secreção de muco, observando-se que a óxido nítrico sintase (NOS) está presente em células epiteliais secretoras de muco. Além disso, dados experimentais indicam também que doadores de NO e análogos do GMPc estimulam a secreção de muco *in vivo* e *in vitro* (BROWN *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1993)

Baseando-se nestes dados, experimentos adicionais com a finalidade de averiguar o envolvimento do óxido nítrico no mecanismo de proteção gástrica do EHPP, foram realizados. Contudo, através dos resultados obtidos foi possível observar que o pré-tratamento dos animais com L-NAME não foi capaz de reverter a citoproteção e a produção de muco promovida pela administração oral do extrato,

sugerindo que provavelmente o NO, não esteja relacionado ao efeito protetor do extrato.

De acordo com os resultados obtidos nesta série de experimentos realizados para verificar a atividade protetora do EHPP, é possível somente afirmar que: (1) o extrato apresenta efeito protetor da mucosa somente no modelo do etanol 70%; (2) este efeito pode ser atribuído ao aumento da secreção de muco gástrico; (3) este efeito protetor provavelmente não envolve interação de componentes do extrato com a síntese ou atividade de prostaglandinas ou ainda a liberação do NO.

Não podemos descartar, no entanto, o possível efeito inibitório do extrato sobre outros mediadores que estariam contribuindo com a ulceração da mucosa. Acredita-se que muitos mediadores como leucotrienos (LT), tromboxano A<sub>2</sub> (TXA), fator de ativação plaquetária e a endotelina – 1 estão implicados na formação da úlcera induzida pelo etanol, principalmente por propiciarem potente vasoconstrição e congestão da mucosa (IAQUINTO *et al*, 2003).

Além disso, a necrose tecidual desencadeada pela isquemia da mucosa gástrica promove liberação de leucotrieno B, que atrai leucócitos e macrófagos, os quais fagocitam o tecido necrosado e liberam citocinas pró-inflamatórias (como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), ativando células epiteliais e endoteliais (TARNAWSKI, 2005). Uma possível questão a ser analisada, seria do efeito citoprotetor do extrato estar ligado a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, visto que tanto o EHPP, como seu composto isolado, a rutina apresentaram atividade antinociceptiva, em modelos de nocicepção induzidos pelas citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Novos experimentos para elucidar os mecanismos envolvidos com esta atividade protetora deverão ser realizados, porém envolverão a padronização de novas metodologias e estudos *in vitro* para confirmação dos resultados.

Em síntese, os resultados do presente trabalho, confirmam alguns de seus usos populares e estendem os dados descritos na literatura, indicando que o EHPP apresenta atividade antinociceptiva, em modelos de nocicepção química induzida pelo ácido acético, formalina, capsaicina e glutamato. Os compostos isolados febalosina, aurapten e rutina, também reduziram a nocicepção induzida pelo

glutamato. Os resultados apresentados são de grande importância, uma vez que a antinocicepção induzida EHPP parece ser dependente de uma interação com receptores ionotrópicos glutamatérgicos tipo NMDA e da inibição da atividade de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ).

Além disso, com este trabalho foi possível confirmar, baseando-se no uso popular da *P. paniculata*, que o EHPP possui atividade antiinflamatória parcial em modelos de inflamação, como o modelo do edema de pata e pleurisia.

Outro dado relevante aqui demonstrado foi a atividade protetora gástrica exercida pelo extrato. Este dado é particularmente interessante, uma vez que esta atividade está ligada ao aumento da produção de muco gástrico, um fator de proteção da mucosa gástrica e não da inibição de um fator agressor, como a produção de ácido gástrico, sendo este o mecanismo comum a todos os medicamentos mais empregados para o tratamento de úlceras gástricas atualmente.

Apesar deste importante resultado, estudos adicionais devem ser realizados com a finalidade de caracterizar de forma mais detalhada os mecanismos envolvidos neste efeito.

Estudos adicionais deverão também ser realizados para a confirmação do preciso mecanismo de ação envolvido na atividade antinociceptiva do EHPP e da rutina. Estudos químicos estão em progresso para caracterizar outros compostos, que talvez contribuam com potencial antinociceptivo, antiinflamatório e protetor gástrico do EHPP.

Neste contexto, o resultado obtido neste estudo nos fornece base farmacológica para utilização da *P. paniculata*, validando seu uso popular e indicando seu potencial terapêutico para o desenvolvimento de novos fitofármacos com propriedades analgésicas, antiinflamatórias e antiulcerosas.



## 7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem estender os dados descritos na literatura, demonstrando que o EHPP e principalmente a rutina apresentam importante ação antinociceptiva.

Analisando os resultados, observou-se que este efeito antinociceptivo pode envolver uma possível ação do EHPP e da rutina em receptores glutamatérgicos ionotrópicos tipo NMDA e inibição da atividade de citocinas pró-inflamatórias.

Além disso, foi demonstrado que o EHPP apresentou atividade antiinflamatória parcial no modelo do edema de pata e pleurisia, porém os mecanismos envolvidos neste efeito não foram esclarecidos.

Foi possível concluirmos também que o extrato bruto da *P. paniculata* exerce atividade citoprotetora gástrica local por um mecanismo que envolve uma elevação na produção de muco e que esta atividade não está relacionada com a redução da secreção ácida gástrica e produção de óxido nítrico.

Experimentos adicionais com o extrato hidroalcoólico e com compostos isolados devem ser realizados para esclarecer melhor o mecanismo de ação envolvido principalmente na atividade citoprotetora quanto na ação antinociceptiva.

Os resultados deste trabalho em conjunto com os dados descritos na literatura, mostram nitidamente que as plantas medicinais são fonte de uma variedade de compostos com potencial atividade biológica que poderão dar origem ou servir de protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou fitofármacos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEREM, A.; SMITH, K.D. A systems approach to dissecting immunity and inflammation. **Sem. Immunol.**, v.16, p.55-67, 2004.

ALIA, M.; MATEUS, R.; RAMOS, S.; LECUMBERRI, E.; BRAVO, L.; GOYA, L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). **Eur. J. Nutr.**, v.45, n.1, p.19-28, 2006.

ALICE, C.B.; SIQUEIRA, S.C.N.; MENTZ, L.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Porto alegre: Editora da Ulbra, p.9, 1995.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, v.1000, p.40-56, 2004.

ALVES, R.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Receptor subtypes involved in tachykinin-mediated edema formation. **Peptides**, v.20, p.921-927, 1999.

ARRIETA, J.; BENITEZ J.; FLORES E.; CASTILHO, C.; NAVARRETE, A.; Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterugium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Med.**, v.69, n.10, p.905-909, 2003.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacol. Res.**, v.47, p. 93-98, 2003.

BAJPAI, M.; PANDE, A.; TEWARI, S.K.; PRAKASHI, D. Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medical plants. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v.59, n.4, p.287-291, 2005.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.**, v.924, p.219-228, 2002.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibre in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Res.**, v. 969, p.110-116, 2003.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Res.**, v. 969, n.1-2, p.110-116, 2004.

BESSON, M. J.; DICKENSON, A. **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer-Verlag, v.130, p.21-41, 1997.

BI, L.C.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal mucosal defense: an integrated protective response. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v.19, p.526-532, 2003.

BOLDI, A. Libraries from natural products-like scaffolds. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.8, p.281-286, 2004.

BROWN, J.; KEATES, A.; HANSON, P.; WHITTLE B. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by gastric mucosal cells. **Am. J. Physiol.**, v.265, p.G418-G422, 1993.

BROWN, J.; HANSON, P.; WHITTLE B. Nitric oxide donors increases mucus gel thickness in rat stomach. **Eur. J. Pharmacol.**, v.223, p.103-104, 1992.

BURGER, D.M.; WIESTNER, T.; HUBLER, M.; BINDER, H.; KEISER, M.; ARNOLD, S. Effects of anticholinergics (atropine, glycopyrrolate) and prokinetics (metoclopramide, cisapride) on gastric motility in beagles and labradors retrievers. **J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.**, v.53, n.2, p.97-107, 2006.

CARR, G.D. **Images and descriptions of flowering plant families**. Poligalaceae. Disponível em: <[www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/polygal.htm](http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/polygal.htm)> Acesso em: 21 fev. 2006.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. YUNES, R. A; CALIXTO, J. B. Chapecó: Editora Argos. p.297-315, 2001.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América. A personal view. **J. Ethnopharmacol.**, v.100, p.131-134, 2005.

CAMPOS, O. P. R.; SANTOS, A. R. S.; VAZ, Z. R.; PINHEIRO, T. R.; PIZZOLATTI, M. G.; CHECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). **Life Sci.**, v.61, n.16, p.1619-1630, 1997.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p.816-824, 1997.

CARLTON, S.M. Peripheral excitatory amino acids, **Curr. Opin. Pharmacol.**, v.1, p.52-56, 2001.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J. Neur. Met.**, v.53, p.55-63, 1994.

CHUNG, I. W.; MOORE, N. A.; OH, W. K.; O'NEIL, M. F.; AHN, J. S.; PARK, J. B.; KANG, Y.S. Behavioural pharmacology of polygalasaponins indicates potential antipsychotic efficacy. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.71, n.1-2, p.191-195, 2002.

CRAIG A. D. Pain mechanisms: Labeled lines versus convergence in central processing. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.26, p.1-30, 2003.

CRISTIANO, R.; PIZZOLATTI, M.G.; DELLE F.M.; REZENDE C.M.; BRANCO, A. Two xanthenes from *Polygala paniculata* and confirmation of the 1-hydroxy-2,3,5-trimethoxy-xanthone at trace level by HRGC-MS. **Z. Naturforsch [C]**, v.58, n.7-8, p. 490-494, 2003.

COSTA, M.; BROOKES, S. J. H. The enteric nervous system. **Am. J. Gastroenterol.**, v.89, p.129-137, 1994.

CORREA, C.R; KYLE, D.J.; CHAKRAVERTY, S. CALIXTO, J.B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B<sub>2</sub> bradykinin and receptor antagonist NPC 18688 in mice. **Brit. J. Pharmacol.**, v.117, n.3, p.552-558, 1996.

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v.32, p.295-310, 1968.

CORNE, S. J.; MORRISEY, S. M. & WOODS, R. J. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J. Physiol.**, v. 224, p.116-117P, 1974.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, p.359-371, 2005.

CRUNKHORN, R.; MEACOCK, S.C.R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **Br. J. Pharmacol.**, v.42, p. 392-402, 1971.

CUNHA F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral hyperalgesic cytokines. **Adv. Exp. Méd. Biol.**, v.521, p. 22-39, 2003.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.72, p.74-79, 1941.

DAVIS, A. J.; PERKINS M. N. The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v.113, p.63-68, 1994.

DAYAL,Y.; De LELLIS, R.A. Trato Gastrintestinal. In : ROBBINS, S.L.; KUMAR, V.; CONTRAN, R.S. **Patologia estrutural e funcional**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1989.

DALL'ACQUA, S.; INNOCENTI, G.; VIOLA, G.; PIOVAN, A.; CANIATO, R.; CAPPELLETTI, E. M. Cytotoxic compounds from *Polygala vulgaris*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.50, n.11, p.1499-1501, 2002.

DE BRITO, F. D. Pleurisy and pouch models of acute inflammation. **Pharmacological methods in the Control of Inflammation**. Dagenham: Rhone Poulenc. p.173-228, 1989.

DESBENE S. ; HANQUET B. ; SHOYMA Y. ; WAGNER H. ; LACAILLE-DUBOIS M. A. Biologically active triterperne saponins from callus tissue of *Polygala amarella*. **J. Nat. Prod.**, v.62, n.6, p.923-926, 1999.

DEMBINSKI, A.; WARZECHA, Z.; CERANOWICZ, P.; BRZOZOWSKI, T.; DEMBINSKI, M.; KONTUREK, S. J.; PAWLIK, W. W. Role of capsaicin sensitive nerver and histamine, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> and H<sub>3</sub> receptors in the gastroprotective effect of histamine against stress ulcer in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v.508, p.211-22, 2005.

De SOUZA, R.F.; De GIOVANI, W.F. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. **Redox. Rep.**, v.9, n.2, p.97-104, 2004.

DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.4, p. 265, 1969.

DOUGLASS, D.K.; CARSTENS, E. Responses of rat sacral spinal neurons to mechanical and noxious thermal stimulation of the tail. **J. Neurosci.**, v.77, p.611-620, 1997.

DRAY, A. Peripheral mediators of pain. In: BESSON, M. J.; DICKENSON, A. **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer-Verlag, v.130, p.21-41, 1997.

DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control. In: BESSON, M. J.; DICKENSON, A. **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer-Verlag, v.130, p.21-41, 1997.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carragenin.. **Eur. J. Pharmacol.**, v.4, p.340-342, 1968.

EKBLAD, E.; MEI, Q.; SUNDLER, F. Innervation of the gastric mucosa. **Micros. Res. Tech.**, v.48, p.241-257, 2000.

EL SAYAH, M., CHECHINEL FILHO, V., PINHEIRO, T. R., YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. In vitro effect of the extract and the 1,7-dihydroxy-2,3-dimethoxy xanthone from *Polygala cyparissias* on the contractions induced by inflammatory mediators and ovalbumin in normal and actively sensitised trachea from guinea pig. **Inflamm Res.**, v.48, n.4, p.218-223, 1999.

ELLIOT, S.N., WALLACE J.L. Nitric oxide: A regulator of mucosal defense and injury. **J. Gastroenterol.**, v.33, p.792-803, 1998.

ELISABETISKY, E. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas.**In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**/Organizado por Simões, C.M.O. et al. Porto Alegre/Florianópolis: 1ed. Universidade/UFRGS/ed. da UFSC, p. 87-99, 1999.

ELIZABETISKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **J. Ethnopharmacol.**, v.51, p.111-120, 1996.

ESTRADA, A.; KATSELIS, G. S.; LAARVELD; BARL, B. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities saponins from *Polygala senega*. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v.23, n.1, p.27-43, 2000.

FANTONE J. C.; WARD, P. A.. Inflamação. In: RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Patologia**. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, p.34-58, 1990.



FARNSWORTH, N. R., BINGEL, A. S. **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Springer: New York; p.61-73, 1997.

FARINA, M.; FRANCO, J.L.; RIBAS, C.M.; MEOTTI, F.C.; PIZZOLATTI, M.G.; DAFRÉ, A.L.; SANTOS, A. R. S. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.57, p.1-6, 2005.

FERREIRA S. H.; LORENZETTI, B. B.; BRISTOW A. F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature.**, v.334, p.698-700, 1988.

FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. A hole for a systemic, spinal and supraspinal L-arginine – nitric oxide – cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacol.**, v.38, p.835-842, 1999.

FILHO, G. B. et al. **Bolioglo Patologia**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 110-143, 1994.

FIORUCCI, S.; SANTUCCI, L.; WALLACE, J. L.; SARDINA, M.; ROMANO, M. ; DEL SOLDATO, P. Interaction of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor with aspirin and NO-releasins aspirin in human gastric mucosa. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.100, n.19, p.10937-10941, 2003.

FOREST & KIM STARR. **Polygala paniculata** L.. Disponível em: <[www.hear.org/starr/hiplants/images/600max/html/starr\\_020803\\_0101\\_polygala\\_paniculata.htm](http://www.hear.org/starr/hiplants/images/600max/html/starr_020803_0101_polygala_paniculata.htm)> Acesso em: 25 fev. 2005.

FUKUSHIMA, Y. *et al.* Unique roles of G-protein-coupled histamine H<sub>2</sub> and gastrin receptors in growth and differentiation of gastric mucosa. **Eur. J. Pharmacol.**, v.502, p.243-252, 2004.

GAVIRAGHI, G. Excitatory amino acid receptors. **Pharm. Act. Helv.**, v.74, p.219-220, 2000.

GENTRY, A. H. **A field guide to the families and genera of woody plants of northwest south America (Colombia, Equador e Peru)**. Chicago: The University of Chicago Press. p.689-693, 1996.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat. Rev.**, v.3, p.104-416, 2004.

GLAVIN, G.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **The FASEB Journal**, v.6, p.825-831, 1992.

GRANDJEAN, P.; WEIHE, P.; WHITE, R.F.; DEBES, F.; ARAKI, S.; YOKOYAMA, K.; MURATA, K.; SORENSEN, N.; DAHL, R.; JORGENSEN, P.J. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.19, p.417-428, 1997.

HENRIQUES, M.G.; SILVA, P.M.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSUREY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.20, n.2, p.243-249, 1987.

HENRIQUES, M.G.; WEG, V.B; MARTINS, M.A.; SILVA, P.M.; FERNANDES, P.D.; CORDEIRO, R.S.; VARGAFTIG, B.B. Differential inhibition by two hetrazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v.99, n.1 p.164-168, 1990.

HENRIQUES, M. G. **Estudo da reação inflamatória induzida por carragenina em camundongos**. Rio de Janeiro, 1993. Tese de Doutorado. Departamento de fisiologia e Farmacodinâmica. Fundação Osvaldo Cruz.

HOGBEN, C.A.M.; KENT, T.H.; WOODHARD, P.A.; SILL,A.J. Quantitative histology of gastric mucosa: Man, dog, cat, guinea pig and frog. **Gastroenterol.**, v.67, p.1143-1154, 1974.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat. Rew. Neurosci.**, v.2, p.83-91, 2001.

HOLZER, P. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v.16, p. 469-478, 2000.

HOLZER, P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. **Adv. Exp. Med.Biol.**, v.298, p.3-16, 1991.

HUNSKAAR, S. e HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, p.103-114, 1987.

HYLDEN, J.K.L., WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur. J. Pharmacol.**, v.67, p.313-316, 1980.

IAQUINTO, G.; GIARDULLO, N.; TACCONE, W.; LEANDRO, G.; PASQUALE, L.; LUCA, L.; SZABO, S. Role of endogenous endothelin-1 in ethanol induced gastric mucosal damage in humans. **Dig. Dis. Sci.**, v.48, n.4, p.663-669, 2003.

ICHIKAWA, T.; ENDOH, H.; HOTTA, K.; ICHIKAWA, K. The mucin biosynthesis stimulated by epidermal growth factor occurs in surface mucus cells, but not in gland mucus cells, of rat stomach. **Lif. Sci.**, v.67, p.1095-1101, 2000.

IKEDA, Y.; UENO A.; NARABA, H.; OH-ISHI. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci.**, v.69, p. 2911-2919, 2001.

ISENBERG, J.; SELLING, J.; HOGAN, D.; KOSS, M. Impaired proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in patients with duodenal ulcer. **New Eng. J. Med.**, v.316, p.374-379, 1987.

ITO, S.; ASHITAKA, O. E.; MINAMI, T. Central and periferal roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. **Neurosci. Res.**, v.41, p.299-332, 2001.

JANCSÓ, G. Pathobiological reactions of C-fibre primary sensory neurones to peripheral nerve injury. **Exp. Physiol.**, v. 77, p.405-43, 1992.

JONES, J.I.W.; HAWKEY, C.J. Physiology and organ-related pathology of the elderly: stomach ulcers. **Best Pract. & Res. Clin. Gastroenterol.**, v.15, n.6, p.943-961, 2001.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.**, v.413, p. 203-210, 2001.

KIM, H.M.; LEE, E.H.; NA, H.J.; LEE, S.B.; SHIN, T.Y.; LYU, Y.S.; KIM, N.S.; NOMURA, S. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on the tumor necrosis factor-alpha secretion from mouse astrocytes. **J. Ethnopharmacol.**, v.61, n.3, p.201-208, 1998.

KIM, H.; KONG, H.; CHOI, B.; YANG Y.; KIM, Y.; LIM, M.J.; NECKERS, L.; JUNG, Y. Metabolic and pharmacological properties of rutin a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. **Pharm. Res.**, v.22, n.9, p.1499-1509, 2005

KLEINSCHNITZ, C., BRINKHOFF, J., ZELANKA, M., SOMMER, C., STOLL, G. The extent of cytokine induction in peripheral nerve depends on the mode of injury and NMDA receptor signaling. **J. Neuroimmunol.**, v.149, p.77-83, 2004.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.4-5, 1988.

KOU J.; MA R.; ZHU D.; YAN Y. Blood-activating and anti-inflammatory actions of *Polygala fallax*. **Zhong Yao Cai.**, v.26, n.4, p. 268-71, 2003.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDAMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; DE LIMA, T. C. M. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento/Organizado por Simões, C.M.O. *et al.* Porto Alegre/Florianópolis: ed. Universidade/UFRGS/ed. da UFSC, p.181-196, 1999.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, v.53, n.4, p.597-652, 2001.

LEE, H.J.; BAN, J.Y.; KOH, S.B.; SEONG, N.S.; SONG, K.S.; BAE, K.W.; SEONG, Y.H. Polygalae radix extract protects cultured rat granule cells against damage induced by NMDA. **Am. J. Chin. Med.** v.32, n.4, p.599-610, 2004.

LEVINE, J.D.; REICHLING, D.B. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. In: Wall PD, Melzack R, editor, **Textbook of pain**. 4 ed., Londres: Churchill Livingstone, p.59-84, 1999.

LLOYD, K.C.; DEBAS, H.T. Peripheral regulation of gastric acid secretion. In: **Physiology of the gastrointestinal tract**. 3ed., Raven Press Ltd., v.2, p.1185-1226, 1994.

LONGHUST, J.C.; KAUFMANN, M.P.; ORDWAY, G.A.; MUSCH, T.I. Effects of bradykinin and capsaicin on endings of afferent fibers from abdominal visceral organs. **Am. J. Physiol. – Regulatory Integrative comparative Physiology**, v.247, n.16, p.R552 – R559, 1984(a).

LONGHUST, J.C.; STTEBINS, C.L.; ORDWAY, G.A. Chemically induced cardiovascular reflexes arising from the stomach of the cat. **Am. J. Physiol. – Heart Circulatory Physiology**, v.247, n.16, p. 459-466, 1984 (b).

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil**. São Paulo, p.386, 2002.

LUFTY, K.; CAI, S.X.; WOODWARD, R.M.; WEBER, E. Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. **Pain**, v.70, p.31-40, 1997.

MAK, N. K.; LUNG, H. L.; WONG, R. N.; LEUNG, H. W.; TSANG, H. Y.; LEUNG, K. N. Expression of protein kinase C isoforms in euxanthone-induced differentiation of neuroblastoma cells. **Planta Med.**, v.67, n.5, p.400-405, 2001.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. **Br. J. Pharmacol.**, v.114, p.1069-1075, 1995.

MANSON, P. Central mechanisms of pain modulation. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.9, p.436-441, 1999.

McNAUGHTON, W., CIRINO, G., WALLACE, J. Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. **Life Sci.**, v.45, p.1869-1876, 1989.

MASUDA, E.; KAWANA, S.; NAGANO, K. Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Gastroenterol.**, v.108, p.58-64, 1995.

MATSUMOTO, Y.; KANAMOTO, K.; KAWAKUBO, K.; AOMI, H.; MATSUMOTO, T.; IBAYASHI, S.; FUJISHIMA, M. Gastroprotective and vasodilatory effects of epidermal growth factor: the role of sensory afferent neurons. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.280, p.G897-G903, 2001.

MENDES, G.; SANTOS, A. R. S.; CAMPOS, M. M. TRATSK, K. S.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; CALIXTO, J. B. Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drymis winteri* (winteraceae). **Life Sci.**, v.63, n.55, p.369-381, 1998.

MELZACK, R.; LOESER, J. D. Pain: an overview. **Pain**, v. 353, p.1607-1609, 1999.

MEOTTI, F. C.; ARDENGHI, J. V.; PRETTO, J.B., SOUZA, M.S.; MOURA, J. D., CUNHA, A.J.; PIZZOLATTI, M.G., SANTOS, A.R. S. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). **J. Pharm. Pharmacol.**, v.58, n.1, p.107-112, 2006.

MESIA-VELA S. **Mecanismos das ações anti-secretora ácida e antiúlcera gástrica de princípios isolados do gervão-roxo (*Starchytarpheta cayennensis* Vahl)**., São Paulo, 1998 (Doutorado em Farmacologia) – Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR), escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

MICELI, N.; TAVIANO, M.F.; GIUFFRIDA, D.; TROVATO, A.; TZAKOU, O.; GALATI, E.M. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* bentham. **J. Ethnopharmacol.**, v.97, n.2, p.261-266, 2005.

MILLAN, M. J. The role of descending noradrenergic and serotonergic parthways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: **The pharmacology of pain.**, BESSON, M. J.; DICKENSON, A. Berlin: Springer-Verlag, v.130, p.385-449, 1997.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v.57, p. 1-164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, v.66, p.355-474, 2002.

MORROW, J.T.; PAULSON. P. E.; BREWER K. L. YEZIERSKI R. P.; CASEY K. L. Chronic selective forebrain responses to endotoxic dorsal horn injury. **Exp. Neur.**, v.161, p.220-226, 1999.

MÓZSIK, G.Y.; ABDEL-SALAM, O.M.E.; SZOLCSANYI, J. **Capsaicin-sensitive afferent nerves in gastric mucosal damage and protection.** Budapest: Akadémiai Kiadó, p. 3-27, 1997.

NEWTON, J. Effect of age related changes in gastric physiology on tolerability of medications for older people. **Drugs Aging**, v.22, n.8, p.655-661, 2005.



NEWALL, A.C.; ANDERSON A.L.; PHILLIPSON, D.J. **Herbal Medicines: A guide for health-care professionals**. 3.ed. London: The pharmaceutical press, p.241,1996.

NEWMAN, D.J.; GRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as source of new drugs over a period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v.66, p.1022-1037, 2003.

NEUGEBAUER, V. Metabotropic glutamate receptors – important modulators of nociception and pain behavioral. **Pain**, v. 98, p.1-8, 2002.

OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. **Brain Res.**, v.787, p.161-164, 1998.

OSBORNE M.G.; CODERRE, T. J. Nociceptives effects of intrathecal administration sulphur-containing amino acids. **Behav. Brain Res.**, v.144, p.105-110, 2003.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurob.**, v.54, p.581-618, 1998.

PAPPAS, N.T. O estômago e o duodeno. In: **Tratado de cirurgia: As bases biológicas da prática cirúrgica moderna**. SABISTON, D.; KYERLY, H.K. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10ed, v.1, p.788-807, 1999.

PIZZOLATTI, M.G.; KOGA, A.H.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from brazilian atlantic rain forest plant species. **Phytomedicine**. v.10, n.5, p.422-426, 2003.

RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.12, p.195-204, 2002.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zimozan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 387, n.1, p.111-118, 2000.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C. & HAUCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterol.**, v. 77, p. 433-443, 1979.

ROCHA E SILVA, M.O. Brief history of inflammation. In: VANE, J.R.; FERREIRA, S.H., **Handbook of Experimental Pharmacology**. New York: Springer-Verlag, p.6-25, 1978.

RUSSO, C.M. & BROSE, W.G. Chronic pain. **Annu. Rev. Med.**, v.49, p.123-133, 1998.

SACHS, G.; ZENG, N.; PRINZ C. Physiology of isolated gastric endocrine cells. **Annu. Rev. Physiol.**, v.59, p.243-256, 1997.

SALEH T. S. F., CALIXTO, J. B. , MEDEIROS, Y. S. Proinflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **Eur. J. Pharmacol.**, v.331, p.43-52, 1997.

SANFELIU, C.; SEBASTIA, J.; CRISTOFOL, R.; RODRIGUEZ-FARRE, E. Neurotoxicity of organomercurial compounds. **Neurotox. Res.**, v.5, p.283-305, 2003.

SANTOS A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v.31, n.4, p.381-389, 1997.

SANTOS, A.R.S.; VEDANA, E.M.A.; De FREITAS, G.A.G. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflam. Res.**, v.47, p. 302-307, 1998.

SANTOS A. R. S.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, *cis*-8,10-di-*N*-propillobelidiol hidrocloreto dihydrate isolated from *Siphocampylus vermicillatus*: Evidence for the mechanism of action. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.289, n.1, p.417-426, 1999.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacol.**, v. 31, p.1279-1285, 1992.

SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TANNO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; HARA, A.; ABIKO, Y. Involvement of nitric-oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioral responses in the mouse. **Neurochem. Int.**, v.29, n.3, p.271-278, 1996.

SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacol. Rev.**, v.55, n.1, p.1-20, 2003.

SCARPIGNATO, S.; CAPOVILLA, T.; BERTACCINI, G. Action of caerulein on gastric emptying of conscious rat. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v.246, p.286-294, 1980.

SCHEIDT, C.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, J.; MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by sesquiterpene drimanol. **Neuropharmacol.**, v.43, p. 340-347, 2002.

SCHUBERT, M. Gastric secretion. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v.21, p.636-643, 2005.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; YESILADA, E. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. **J. Ethnopharmacol.**, v.100, p.61-66, 2005.

SELLOUM, L.; BOURICHE, H.; TIGRINE, C.; BOUDOUKHA, C.; Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v.54, n.4, p.313-318, 2003.

SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S.E.; MERAZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterol.**, v.5, p. 43-61, 1945.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammation response. **Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, v.18, n.3, p. 385-405, 2004.

SILVA A. R.; LARANGEIRA, A.P.; PACHECO, P.; CALIXT, J.B.; HENRIQUES, M.G.; BOZZA, P.T; CASTRO-FARIA-NETO, H.C. Bradykinin down-regulates LPS-induced eosinophil accumulation in the pleural cavity of mice through type 2-kinin receptor activation: a role for prostaglandins. **Br. J. Pharmacol.**, v.127, n.2, p.569-575, 1999.

SKALISZ L. L.; BEIJAMINI V.; ANDREATINI, R. Effect of *Hypericum perforatum* on marble-burying by mice. **Phytot. Res.**, v.18, n.5, p.399-402, 2004.

SMITH, D. L.; D'AMOUR, M.C; D'AMOUR, F.E. Analgesic properties of certain drugs and drugs combination. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, n.77, p.184-193, 1943.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci. Lett.**, v.361, p.184-187, 2004.

SYRIÁTOWICZ, J.P.; HU, D.; WALKER J.S.; TRACEY, D.J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. **Neurosci.**, v.94, n.2, p.587-594, 1999.

SZABO, S. TRIER, J. BROWN, A. e SCHNOOR, J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterol.**, v.88, p.228-236, 1985.

TARNAWSHI, A. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Dig. Dis. Sci.**, v.50, s.1, S24-S33, 2005.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: **The pharmacology of pain.**, BESSON, M. J.; DICKENSON, A. Berlin: Springer-Verlag, p. 21-41, 1997.

TJØLSEN, A.;BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.;HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, n.1, p.5-17, 1992.

VAN RENSBURG, C. J.; HARTMANN, M.; THORPE, A.; VENTER, L.; THERON, I.; LÜHMANN, R.; WURST, W. Intragastric pH during continuous infusion with pantoprazole in patients with bleeding peptic ulcer. **Am. J. Gastroenterol.**, v.98 n.12, p.2636-2641, 2003.

VANEGAS, H. To the descending pain-control system in rats, inflammation-induced primary and secondary hyperalgesia are two different things. **Neurosci. Letters.**, v.361, p.225-228, 2004.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Prostaglandins and cyclooxygenases in spinal cord. **Prog. Neurob.**, v.64, p.327-363, 2001.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain. Res. Rev.**, p.1-15, 2004.

VIANNA, R. M. J.; CALIXTO, J. B. Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg9-bk in mouse pleurisy. **Br. J. Pharmacol.**, v.123, p.281-291, 1998.

VITKOVIT, L.; BOCKAERT, J.; JACQUE, C. "Inflammatory" cytokines : neuromodulators in normal brain? **J. Neurochem.**, n.74, p.457-471, 2000.

VONGTHAVARAVAT, V.; MESIYA, S.; SAYMEH, L.; XIA, Y.; HARTY, R. Mechanisms of transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) induced gastroprotection against ethanol in the rat. **Dig. Dis. Sci.**, v.48, n.2, p. 329-333, 2003.

WAGNER, L. W. **Pacific Island Ecosystems at risk (PIER)**. Disponível em: <<http://www.hear.org/Pier/imagepages/singles/poppanp57.htm> > Acesso em: 06 jul. 2005.

WALLACE, J. L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **Amer. J. Med.**, v. 110, p.19S-23S, 2001.

WASICKY, R. **Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo**, v.4, São Paulo, p.189-217, 1945.

WHITTLE, B.J.R. Mechanisms underlying intestinal injury induced by anti-inflammatory COX inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.**, v.500, p.427-439, 2004.

WIECH, K.; KIEFER, R.T.; TOPFNER, S.; PREISSEL, H.; BRAUN, C.; UNERTL, K.; FLOR, H.; BIRBAUMER, N. A placebo-controlled randomized crossover trial of the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb pain. **Anesth. Analg.**, v. 98, p.408-413, 2004.

WIESELER-FRANK, J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Glial activation and pathological pain. **Neurochem. Intern.**, v.45, p.386-395, 2004.

WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Neuroanatomy of the pain system that modulate pain. **J. Clin. Neurophysiol.**, v.14, p.3-31, 1997.

WINTER, C.; RISLEY, E.; NUSS, G. **Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs.** In: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine III. p. 544, 1962.

YAMAKURA, T.; SHIMOJI, K. Subunit- and site specific pharmacology of the NMDA receptor channel. **Prog. Neurob.**, v.59, p.279-298, 1999.

YAO, X.; FORTE, J. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. **Annu. Rev. Physiol.**, v.65, p.103-131, 2003.

ZHOU, S.; BONASERA, L.; CARLTON, S.M.; Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviour in rats, **Neuroreport.**, v.7, p. 895-900, 1996.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain.**, v.16, p.109-110, 1983.

